

IVONE GARROS ROSA

ESTUDOS DAS HEMICELULOSES DO CAULE DA *Acácia mollissima*.

Tese de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica
da Universidade Federal do
Paraná.

Curitiba
1981

Tese orientada pelo
Prof. Dr. João Batista Chaves
Corrêa

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. João Batista Chaves Corrêa pela orientação e constante apoio amigo, saudável e incentivador.
- Ao Prof. José Domingos Fontana pela colaboração na correção redacional da tese.
- À Coordenação do aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) , pela bolsa de estudos concedida.
- Ao CNPq e FINEP pela ajuda financeira concedida.
- À Coordenação e aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UFPr.
- Aos colegas do curso de pós-graduação pelo apoio e amizade que foi uma constante e às demais pessoas que contribuíram para a elaboração desta tese.
- A todas as pessoas de boa vontade que contribuíram direta ou indiretamente para o desempenho desta tese.

RESUMO

O caule de *Acácia mollissima* isento de lipídeos e material pectico foi extraído com DMSO e obteve-se uma fração polissacarídica denominada "hemicelulose DMSO", solúvel em água e constituída por unidades de D-xilose (35,36), D-glucose (58,54%) e D-galactose (4%). Os dados de metilação indicaram predominância de ligações do tipo α -(1→4) para as unidades de D-glucopiranoses (50%) e de D-xilopiranoses (24%). A presença de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (5%), 2,3-di-O-metil-D-glucitol (4,3%) e 2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol (1,3%), indicaram estrutura ramificada para este polímero. Esta fração apresentou uma rotação ótica de $[\alpha]_D^{25} = + 35^\circ$ (água). A eletroforese em acetato celulose apresentou além da banda principal uma pequena contaminação confirmada por filtração em gel. A moderada complexação como iodo-iodeto de potássio, conforme Gaillard, confirmou a estrutura ramificada para este polissacarídeo.

O resíduo da extração com DMSO foi re-extraído com uma solução de NaOH 1N e obteve-se a "Hemicelulose A". Esta fração apresentou uma rotação ótica de $[\alpha]_D^{25} = - 41^\circ$ (água) evidenciando ser constituída principalmente por anômeros β de D-xilose (88%); unidades de D-glucose (7%) e ácido urônico (5%). A metilação deste polissacarídeo e a análise na forma de seus respectivos alditóis acetilados indicaram como principal componente o 2,3-di-O-metil-D-xilitol (85,5%), compatível então com uma cadeia principal formada por unidades de D-xiloses ligadas através de ligações do tipo β -(1→4) com unidades de ácido urônico ligados ao C-2 da cadeia do xilano. O polissacarídeo apresentou ramificações, provavelmente por unidades de D-xiloses ligadas a C-2 e C-3 da cadeia principal.

SIGLAS E ABREVIATURAS

DMSO - sulfóxido de dimetila ou dimetil sulfóxido

Hem. A - hemicelulose A

H-DMSO - hemicelulose DMSO

Hem. B - hemicelulose B

GLC - cromatografia em fase gasosa

TLC - cromatografia em camada delgada

c.p. - cromatografia em papel

EDTA - etileno diamino tetra acetato dissódico

Et-OH - etanol

v/v - volume a volume

TFA - ácido trifluoracético

d.i. - diâmetro interno

G.P. - grau de polimerização

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Esquema 1. Representação esquemática da extração e isolamento das hemiceluloses da <i>A. mollissima</i>	38
Tabela I. Análises das frações polissacarídicas existentes nas hemiceluloses A, B e H-DMSO da <i>A. mollissima</i>	39
Tabela II. Análise por GLC dos alditóis acetilados derivados das frações I e II da H-DMSO filtrada na coluna de Sephadex G ₁₀₀ + 200	40
Tabela III. Produtos resultantes da degradação tipo Smith das hemiceluloses: A e H-DMSO.....	41
Tabela IV. Análise por GLC dos produtos de metanólise da hemicelulose A metilada	42
Tabela V. Análise por GLC dos produtos de hidrólise ácida da hemicelulose A metilada, na forma de seus respectivos alditóis acetilados	43
Tabela VI. Análise por GLC dos produtos de hidrólise ácida da hemicelulose DMSO metilada, na forma de seus alditóis acetilados	44
Tabela VII. Análise por GLC dos ácidos albiurônicos do hemicelulose A, da <i>A. mollissima</i> , carboxi-reduzidos, na forma de seus respectivos alditóis acetilados após hidrólise.....	45
Tabela VIII. Análise por GLC do aldobiurônico da hemicelulose A da <i>A. mollissima</i> metilada, carboxi-reduzido, remetilado na forma de alditóis acetilados, após hidrólise	46
Tabela IX. Análise por GLC dos alditóis acetilados parcialmente metilados da hemicelulose A original e modificada por prévia acetilação	47

Figura 1.	Complexação das hemiceluloses A e H-DMSO com iodo	48
Figura 2.	Filtração em gel da hemicelulose H-DMSO	49
Figura 3.	Possível estrutura de hemicelulose A da <i>A. mollissima</i>	50
Figura 3A.	Degradação tipo Smith da hemicelulose A da <i>A. mollissima</i>	51
Figura 4.	Possível estrutura da hemicelulose A da <i>A. mollissima</i> original e modificada	52
Figura 5.	Cromatografia em GLC dos produtos de hidrólise ácida parcial da fração ácida da hemicelulose DMSO	53

PEQUENO GLOSSÁRIO BOTÂNICO (4)

Angiosperma. Planta fanerogâmica que tem os óvulos dentro de uma cavidade fechada denominada ovário. Dividem-se em Monocotiledôneas e Dicotiledôneas, conforme o número de cotilédones nas plantas. Sin. Angiospérnica.-Fanerocarpo.-Metasperma.

Monocotiledôneas. São vegetais caracterizados por terem raízes fasciculadas, caule astélico, sem câmbio, folhas geralmente paralelinerveas, flores trímeras e na semente existe um único cotilédone. De todas as características citadas há exceções (Gr. Kotyledon, cavidade na forma de taça). Sin. Anfíbrios.-Endógenas.-Endorizas.-Unicotiledôneo.-Monocótilo.

Dicotiledôneas. São Angiospermas que apresentam folhas com nervação reticuladas, flores dímeras ou pentâmeras, feixes vasculares com câmbio, embrião com dois cotilédones. (Gr. di. dois + Kotyledon, cavidade). Sin. Dicotíleas-Dicotiledôneos-Exógenas.

Gimnosperma. São plantas fanerogâmicas caracterizadas pela ausência de ovário fechado nas flores e apresentação de sementes livres de qualquer invólucro. Os carpelos ou macrosporófilos desprovidos de pistilo com óvulo descobertos, isto é, não fechados num ovário. Tem o mesmo ciclo evolutivo que as Angiospermas (Gr. Gymnos, nu + esperma, semente). Sin. Arquisperma.-Gimnosperma.-Policotiledôneas.-Saccoculadas, de Van Tieghem.

Coníferas. É a principal classe das Gimnospermas, quase todas, arbóreas, de órgãos reprodutores em cones. (Lat. conif., que tem frutos em cones). Ex. os pinheiros.

	Página
RESUMO	i
SIGLAS E ABREVIATURAS	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
PEQUENO GLOSSÁRIO	v
ÍNDICE	vi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Parede celular vegetal	01
a) Celulose	02
b) Substâncias pécicas	02
c) Gomas e mucilagens	03
d) Ligninas	03
e) Cutina, suberina e graxas	03
f) Proteínas	03
g) Hemicelulosos	04
g.1 - Xilanos	06
g.2 - Glucanos	08
g.3 - Xiloglucanos	09
1.2. <i>Acácia decurrens</i> , var. <i>mollissima</i> - A. <i>Adenophora Spreng.</i>	09
1.3.Considerações sobre classificação da madeira	11
1.4.Objetivo	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1. Métodos Gerais	15
2.1.1. Eletroforese	15
2.1.2. Cromatografias	15
2.1.2.1. Cromatografia em papel (c.p.)	15
2.1.2.2. Cromatografia em camada delgada (TLC)	16
2.1.2.3. Cromatografia em fase gasosa (GLC)...	16
2.1.3. Polarimetria	18
2.1.4. Determinações colorimétricas	18
2.1.4.1. Hexoses e pentoses totais	18
2.1.4.2. Proteínas	18

	Página
2.1.4.3. Ácidos Urônicos	18
2.1.4.4. Grupos <u>O</u> -Acetil	18
2.1.5. Outros procedimentos	18
2.2. Métodos específicos	20
2.2.1. Tratamento inicial do material	20
2.2.2. Extração e isolamento das hemiceluloses de <i>A. molíssima</i>	20
2.2.2.1. Extração com Dimetil Sulfóxido (DMSO)	20
2.2.2.2. Extração com hidróxido de sódio (NaOH)	21
2.2.3. Interação dos polissacarídeos com iodo de acordo com o método de Gaillard....	22
2.2.4. Filtração em gel de hemicelulose DMSO ...	22
2.2.5. Oxidações das hemicelulose A e DMSO, com periodato de sódio	23
2.2.6. Degradação clássica do tipo Smith das hemiceluloses A e H-DMSO	23
2.2.7. Análise por metilação das hemiceluloses A e H-DMSO.....	24
2.2.8. Hidrólise ácida parcial das hemiceluloses A e H-DMSO.....	25
2.2.9. Degradação da hemicelulose A acetilada..	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
TABELAS E GRÁFICOS	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Parede celular vegetal

A parede celular dos vegetais está fundamentalmente envolvida em vários aspectos da biologia vegetal, incluindo morfologia, crescimento e desenvolvimento das células. A parede celular distribui-se em dois tipos de estrutura: parede primária e parede secundária.

As paredes primárias são transformadas em secundárias após o amadurecimento das células, ou seja, após as mesmas terem atingido o seu estado adulto (87). São constituídas por células meristemáticas durante a divisão celular. Usualmente são hidratadas e possuem meio opticamente anisotrópico. As paredes primárias de células contíguas são cimentadas por uma substância intercelular, opticamente isotrópico que constitui a lamela média (7). A parede primária celular consiste ainda, quase totalmente de polissacarídeos, cujas unidades monossacarídicas são pentoses e hexoses; 90% do material estrutural é polissacarídeo (2).

Na parede primária, as fibrilas da celulose, que é um polímero formado de unidades de Glucose $(C_6H_{10}O_5)_n$, apresentam-se como um material rígido cristalino, formando um esqueleto de microfibrilas mergulhado numa matriz de pectina, hemicelulose e algumas proteínas (84). Usualmente as fibrilas apresentam alguma desordem em relação à direção comum, e numa célula alongada encontram-se colocadas transversalmente ao longo do eixo celular. Parte da desordem é causada pela expansão da parede durante o crescimento da célula. Esta estrutura é encontrada nas paredes das células das fibras do algodão (7).

A parede secundária é constituída de microfibrilas de

celulose bem organizadas e paralelamente arranjadas, onde se pode distinguir três camadas: a interna, a externa e a intermediária ou média. As duas primeiras são finas e birefringentes em seção transversal, enquanto que a última varia de espessura de acordo com a idade da madeira, sendo menos birefringente na seção transversal. As diferenças na birefringência são dadas pelos diferentes rearranjos das microfibrilas celulósicas. Na camada interna e externa as microfibrilas são bem orientadas e apoiam-se em hélices planas. Já na camada média ou intermediária, as microfibrilas são menos orientadas e apoiam-se em hélices inclinadas (7).

Nas células adultas a parede secundária é geralmente espessa, fortemente anisotrópica e estruturalmente complexa(7).

A parede celular de vegetais superiores, como anteriormente citado, é geralmente constituída das seguintes substâncias, sob o ponto de vista químico:

a) Celulose.

Componente básico da maioria das paredes celulares vegetais, é constituída totalmente por unidades de glucose, ligadas em longas cadeias lineares (2). A celulose forma microfibrilas paralelamente arranjadas que medem de 100-200 Å em microscópio eletrônico(7).

b) Substâncias pécnicas.

A pectina é geralmente encontrada na parede celular primária e na parede intercelular das plantas terrestres. É encontrada em grandes proporções em tecidos moles, tais como cascas de frutas cítricas (30%), polpa de beterraba (25%) e maçãs (15%). Porém, está presente em pequenas proporções nos tecidos da madeira. O termo subs

tância pectica é geralmente empregado para designar um grupo complexo de polissacarídeos, no qual o ácido D-galacturônico é o principal constituinte (93).

c) Gomas e mucilagens.

São grupos heterogêneos de substâncias contendo ácido urônico e resíduos de outros açúcares. A goma ocorre como exsudato de cortiça e folhas (7).

d) Ligninas.

São macromoléculas formadas por unidades monoméricas de compostos relacionados ao fenilproprano, interligadas através de ligações éter e também ligação covalente carbono a carbono. Este último tipo de ligação é altamente resistente à degradação química e constitui o principal fator retardatário na conversão da lignina a unidades monoméricas durante reações de etanólise e hidrogenação.

A lignina é considerada um material incrustante nos vegetais e desta forma não pode ocorrer sozinha na natureza e sim coexistindo com outros componentes de natureza polissacarídica da parede celular (76).

e) Cutina, suberina e graxas.

São as substâncias lipídicas mais importantes da parede celular. Elas servem para impermeabilizar as partes periféricas da planta, evitando assim a penetração da água. A cutina e a suberina são altos polímeros de ácidos graxos (7).

f) Proteínas

São polímeros de aminoácidos e são encontradas em pe-

quena quantidade, particularmente nas paredes primárias. A mais importante fração é representada por enzimas e transportadores associados com a fisiologia da parede primária (7).

g) Hemiceluloses.

Termo adotado por E. Schulze em 1891 para descrever os polissacarídeos extraídos de vegetais com soluções alcalinas (93). É mais empregado para polissacarídeos da parede celular de vegetais terrestre (80).

As hemiceluloses são substâncias de diferente constituição química as quais se dissolvem em solução alcalina e água quente acidulada. São facilmente hidrolisadas transformando-se em monossacarídeos (92). Algumas hemiceluloses são cristalinas e mesmo os espaços entre os cristais também já foram determinados (93).

A preservação das hemiceluloses durante o processo de fabricação da polpa de celulose permite uma maior facilidade na refinação das fibras. Além disso, diferentes teores em hemicelulose conferem qualidades específicas a certos tipos de papéis. As hemiceluloses também servem como nutrientes para leveduras e elas podem ser usadas como matéria prima na produção de furfural e possivelmente de álcool etílico (75).

Os açúcares que podem ocorrer nas hemiceluloses são : D-xilose, D-manose, D-glucose, D-galactose, L-arabinose, ácido D-glucurônico, 4-O-Metil-D-glucurônico, ácido-D-galacturônico e em pequenas quantidades, L-ramnose, L-fucose e vários açúcares neutros parcialmente metilados (91).

De acordo com Jones (54), as hemiceluloses são polissacarídeos de peso molecular relativamente baixo, bem inferior ao da celulose, as quais são encontradas normalmente em tecidos vegetais.

As hemiceluloses acídicas de madeiras duras são aparentemente isentas de L-arabinose (93). As plantas anuais contêm cerca de 15 a 30% de hemiceluloses, as madeiras duras de 20 a 25% e as madeiras moles 7 a 12% (93).

As hemiceluloses da madeira dura, por exemplo, possuem um grau de polimerização (G.P.) que varia entre 150 a 200 unidades de açúcar. Algumas, entretanto, apresentam um G.P. inferior, em torno de 50 a 100 (87).

Uma boa parte das hemiceluloses de madeira é formada por moléculas neutras e possui um esqueleto constituído de unidades de xilopiranoses com ligação β -D-(1 \rightarrow 4). A cadeia pode apresentar uma estrutura linear mas frequentemente ocorre também em estrutura ramificada (93).

É muito difícil o isolamento de um polissacarídeo homogêneo a partir da mistura complexa de polissacarídeos típica de tecidos vegetais. Um relativo critério de homogeneidade pode ser conseguido por ultracentrifugação e eletroforese (93). Todos os polissacarídeos são precipitáveis em solução aquosa diluída pela gradual adição de etanol (91).

Jones & Wise (53) isolaram hemiceluloses de "aspen sawdust", tendo identificado vários açúcares como: D-xilose, xilobiose, xilotriose, ácido 4-O-Metil- α -D-glucopiranosilurônico ligado à posição 2 das unidades de D-xilopirranose.

As cadeias de hemiceluloses são geralmente arranjadas ao acaso na parede celular. Juntamente com as substâncias pecticas formam a maior parte da parede primária. Os mananos, os galactanos e particularmente os xilanos são os maiores constituintes das paredes secundárias dos vegetais (7).

As hemiceluloses são mais facilmente extraídas de tecidos vegetais após remoção de lipídeos e ligninas. A remoção de lig

nina facilita a dissolução da hemicelulose em álcali e permite o isolamento da hemicelulose pura (80). Campbell (20) delignificou a faia européia (*Fagus sylvatica*) e o abeto vermelho (*Pinus sitchensis*) com solução aquosa de NaOCl pH 6,3, a 50°C e 70°C, conseguindo a remoção de 90% de lignina.

Para eliminação dos lipídeos pode-se usar uma mistura azeotrópica de benzeno: etanol, a quente (93).

A classificação da hemicelulose em hemicelulose A e B foi introduzida pela autora O'Dwyer (68). Nesta convenção a hemicelulose A é uma fração insolúvel em água, a qual é precipitada na neutralização de um extrato alcalino com ácido acético até pH 4,0 - 5,0. A hemicelulose B solúvel no neutralizado, pode ser precipitada com 3 - 5 volumes de EtOH, e a porção remanescente no sobrenadante etanólico é denominado hemicelulose C.

g.1. Xilanos

Estas hemiceluloses existem em quase todos os tecidos vegetais e são constituídas, na maioria das vezes, de unidades de D-xilose, formando uma cadeia principal linear na qual podem estar a nexadas unidades simples de L-arabinose e também unidades simples de ácido urônico. Sabe-se que, pelo menos, dois tipos de xilanos ocorrem na natureza, um com e outro sem ácido urônico ligado glicosidicamente (91). Os xilanos geralmente são insolúveis em água, porém são bastante solúveis em solução alcalina e são hidrolizados facilmente com ácidos minerais diluídos. Possuem rotação ótica negativa, já que a

configuração do carbono anomérico é do tipo " β " (90). O xilano nativo pode ocorrer parcialmente esterificado com ácido acético ao nível da xilose. Este fato é comprovado pela observação de que a maioria das holoceluloses contém uma pequena quantidade de ácido acético (91).

A maioria dos trabalhos sobre estrutura de xilanos tem sido elaborado em "esparto grass" (gramínea). Várias pesquisas realizadas em xilanos de gramíneas demonstram que possuem a mesma estrutura básica com relação às unidades de D-xilopiranosose interligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4), (6). Porém diferem no arranjo estrutural de outras unidades de açúcares, especialmente da L-arabinose, e do ácido 4-O-Metil-glucurônico. Os xilanos de gramíneas e cereais são geralmente caracterizados pela presença de resíduos de L-arabinofuranose ligados à cadeia principal, por uma cadeia lateral de uma única unidade, normalmente na posição do carbono 3 do resíduo de xilose (6).

Os xilanos de madeira são caracterizados pela presença de unidades singulares de ácido 4-O-Metil-D-glucurônico ligado na posição 2 das unidades de D-xilose da cadeia linear principal (6). A primeira evidência para a estrutura química destes polímeros surgiu do isolamento da xilobiose, xilotriose e do ácido aldobiurônico, |2-O-(4-O-Metil- α -D glucosilurônico)-D-xilose na hidrólise ácida parcial do xilano de álamo (*Aspen wood*) (53).

Os xilanos de diversas madeiras diferem em tamanho molecular e na proporção das unidades de ácido hexurônico ligadas à cadeia lateral. Em geral a proporção de unidades de ácido 4-O-Metil-D-glucurônico é maior nos xilanos de madeiras moles (cerca de 15 a 20%) do que nos das madeiras duras (8 a 15%).

g.2 - Glucanos

Reid & Wilkie (73) em 1969, verificaram que as hemiceluloses totais da aveia (*Avena sativa*, var. *Blenda*), eram constituídas de D-galactose: D-glucose: L-arabinose: D-xilose, na proporção de (2,8:11,4:10:23,5). A variação na proporção das unidades de D-glucose foi decorrente da presença de um homoglucano. Sabe-se ainda que três hemiceluloses puras, foram isoladas de tecidos não endospermicos (folhas, colmo, raiz) da aveia (*Avena sativa*): um arabinoxilano, um galactoarabinoxilano e um glucano.

Frazer & Wilkie (34) isolaram glucanos puros de uma fração das hemiceluloses totais de folhas de *Avena sativa* var. *Blenda*, em diferentes estágios de amadurecimento, com elevado grau de polimerização para investigar a relação entre a maturidade da planta e a composição do β -Glucano.

Em outro trabalho (35), os mesmos autores, ao investigarem as relações entre maturidade da planta e composição do β -Glucano encontrado na porção solúvel da hemicelulose total de *Avena sativa* (folhas, raízes e coleótilos) verificaram que a razão das ligações do tipo (1 \rightarrow 3) para (1 \rightarrow 4) nos glucanos de diferentes tecidos diminuía à proporção que a planta tornava-se adulta.

Um estudo parecido foi realizado por Buchala & Wilkie (18) quando, em 1971, consideraram os glucanos, presentes na hemicelulose total de aveia (*Avena sativa*, var. *Blenda*) como polissacarídeo de reserva. Estudaram ainda, a relação das ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) entre as unidades de D-glucose, nos diferentes tecidos endospermicos desta planta em vários estágios de amadurecimento.

Wilkie, (94) numa recente revisão sobre hemiceluloses de capim e cereais fez uma importante ressalva em relação ao efeito do crescimento ou estágio de amadurecimento na composição hemicelulósica das plantas.

g.3 - Xiloglucano

Sriyastava & Singh (82) ao isolarem e caracterizarem um xiloglucano de semente de tamarindo (*Tamarindus indica*), observaram que era constituído de glucose, xilose e galactose na proporção molar de 3:2:1.

Mais tarde, em 1976 Kato & Matsuda (56) trabalhando na caracterização de um β -glucano de material não celulósico da parede celular de hipocotilêdones de "feijão mung" (*Phaseolus aureus*), evidenciaram a presença de um xiloglucano, também chamado amilóide por formar uma coloração azul em presença do iodo. O xiloglucano era constituído de glucose, xilose e pequenas quantidades de outros açúcares, demonstrando conter uma cadeia principal idêntica a da celulose, ligada por unidade de D-glucopiranosose através da ligação do tipo β -(1 \rightarrow 4).

1.2 - *Acácia decurrens* (*A. decurrens* Wild, var Wild. var *mollissima* (Willd)-Lindl)-(*A. adenophora* Spreng) = *A. mollissima*.

A *Acácia decurrens* é uma angiosperma com ramos decorrentes, folhas compostas e permanentes, flores amarelo-claro, aromáticas e melíferas, dispostas em capítulos globosos, paniculados, formando cachos compridos e pendentes. É considerada a melhor das espécies deste gênero botânico, pela sua riqueza em tanino. É ainda árvore ornamental e de sombra (22). Pertence à família das leguminosas e sub-família *Mimosaceae*. Há mais de 40 anos ela é plantada no Brasil, sendo bastante cultivada nos Municípios de Cantareira, Pirituba, Campinas (SP) e em grande escala em São José dos Campos (SP). Seu cultivo em São Leopoldo (RGS) remonta a 1916.

A *Acácia mollissima* é conhecida também pelo nome de

monjolinho, acácia negra, acácia noir pelos franceses; Black-Wattle pelos norte americanos e alemães; e Tan-Watter pelos australianos e ingleses (22).

As Acácias são plantas de habitat muito variável; vivem nos mais variados ambientes, em diferentes latitudes e altitudes (52). A acácia negra teme os frios extremados, geadas e sêcas prolongadas; entretanto suporta temperaturas de menos de 6°C (60).

A *Acácia mollissima* é especialmente importante porque possui um crescimento rápido, fornecendo madeira branca com cerne a vermelhado, elástica, bastante utilizada em construção civil. É empregada em reflorestamento, pois cresce nos primeiros anos mais rápido do que o eucalipto. Produz grande quantidade de tanino e é considerada mundialmente como uma importante espécie tanífera segundo análise de Müller (22) em 1885.

A Acácia negra, como também é chamada entre as plantas produtoras de tanino, é a mais recomendada pelo seu rápido desenvolvimento e pela sua grande produção de matéria prima para os curtumes. A casca de Acácia negra (5 a 7 Kg/espécime adulto) apresenta um teor médio de 55% em tanino (60).

A Acácia negra, juntamente com o eucalipto e a braca-atinga são espécies usadas com bons resultados no reflorestamento.

A madeira da Acácia negra apresenta um peso específico variável de 0,6 a 0,9, sendo portanto relativamente dura, sobretudo o cerne. É empregada em construção civil, freio de veículos, marcenarias, cabos de ferramenta, escora para mina, lenha para fogão e locomotiva. Dela pode-se obter um carvão com poder calorífico calculado em 7.600 calorias (60).

Exsuda goma consistente de qualidade variável, amarela ou vermelha, idêntica à "goma arábica". A goma fornecida na estação quente é de qualidade inferior, mas tem servido para substituir a goma arábica, utilizada para a colagem de selos, rótulos, estampilhas, estamparia de chita e outros tecidos. A cor varia do amarelo ao âmbar carregado.

Segundo Zimmermann (71), o tratamento por destilação seca da madeira pode produzir 27,3% de carvão; 5,1% de ácido acético; 1,21% de álcool metílico; 0,24% de acetona e 11,7% de alcatrão. A cinza fornece 2,11% de P_2O_5 ; 6,98% de K_2O e 45% de CaO .

Secor et al. (78), em 1976, constataram a presença de compostos cianogênicos em seis espécies de Acácia.

Como leguminosa contém nas raízes microorganismos fixadores de nitrogênio (71).

1.3 - Considerações sobre classificação de madeiras.

As madeiras são classificadas em dois grandes grupos : madeira mole e madeira dura. Considera-se madeira mole ao lenho das gimnospermas o qual tem estrutura homogênea com predominância de elementos longos e retos. É bastante apropriada para a fabricação de polpa de celulose de fibra longa, própria para a fabricação de papéis de alta resistência. Entre as gimnospermas somente as coníferas constituem fontes importantes de madeira comercial.

Considera-se madeira dura o lenho da angiosperma, que possui a propriedade de ser resistente e densa, devido à elevada proporção de fibrotraqueídeos e de fibras libriformes. Exemplos: Carya, Acácia, etc..

Entre as angiospermas são as dicotiledôneas que constituem fonte importante de madeira comercial (29). Atualmente são também importante fonte da matéria prima para a fabricação de polpa de celulose de fibras curtas, muito utilizada na produção de papéis de impressão.

1.4 - Objetivo

A *Mimosa bracaatinga* é nativa de zonas temperadas do Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e São Paulo). Foi botanicamente classificada por HOEHNE, como *Mimosa bracaatinga*, em homenagem aos índios do sul do País e o nome em língua guarani significa: "chocalho branco". É uma árvore cujo tronco avermelhado ou branco, dificilmente ultrapassa 40 cm de diâmetro. As folhas apresentam-se duplo-pinadas com folíolos pequenos oblongos e as flores em umbelas globulares nas axilas das últimas folhas dos ramos. Produz lenha com alto teor calorífico e seu caule é empregado como vigas de escoras pelas empresas de construção civil. O caule é ainda aproveitado na fabricação de papel de embrulho e higiênico. É útil também na fabricação de móveis, carvão para metalurgia, etc.

As hemiceluloses da *Mimosa bracaatinga*, Hoehne, foram estudadas por Correa et al (24) e Gomes (45). Os referidos autores observaram que a hemicelulose A desta madeira era um (4-O-Metil-D - Glucurono) xilano, cuja cadeia principal consistia de aproximadamente 118 resíduos de D-xilopiranose interligados glicosidicamente por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4). A análise do aldobiurônico isolado desta fração hemicelulósica, correspondia ao ácido (4-O-Metil- α -D-glucopiranosilurônico) ligado à unidade de D-xilopiranose na posição 3.

Uma fração de hemicelulose extraída com DMSO por Oli-

veira (69) do caule parcialmente delignificado de *M. bracaatinga*, continha cerca de 20% de grupos O-Acetil, ligados a C-2, a C-3 e simultâneamente a C-2 e C-3 das unidades de D-xilopiranosose. A análise por metilação mostrou que estruturalmente era semelhante à hemicelulose A, desta mesma madeira.

Gebara (42) e Zermiani (98), ampliaram os conhecimentos a respeito da hemicelulose A da *M. bracaatinga*, utilizando uma hemicelulase produzida pelo fungo *Polyporus circinatus* (31). Consta tou-se a presença de D-xilose resistente à oxidação com periodato nos oligossacarídeos neutros e ácidos resultantes da hidrólise enzimática, sugerindo, assim, a possibilidade de ramificação em C-3 ou C-2 das unidades de D-xilopiranosose da cadeia principal.

A estrutura fina da hemicelulose A da *M. bracaatinga*, foi posteriormente estudada com mais profundidade por Zermiani (98). Os resultados obtidos sugerem um xilano formado basicamente por cadeia de D-xilopiranosos, ligadas através de β -(1 \rightarrow 4), entretanto, e existem evidências da existência de um reduzido número de unidades de D-xilopiranosos interligadas através de β -(1 \rightarrow 3) na cadeia principal. Unidade de 4-O-Metil-glucurônico e provavelmente ramificações por D-xilose ligam-se a C-2 das unidades de D-xilose na cadeia principal.

A somatória de conhecimentos acumulados a respeito da hemicelulose A de *M. bracaatinga*, fornece uma idéia estrutural bem avançada a respeito deste xilano acídico, tornando-o então um modelo ideal para estudos comparativos com frações hemicelulósicas de outros vegetais de interesse botânico e comercial como a *Acácia molíssima*.

Tendo em vista a semelhança botânica entre as leguminosas *A. mollissima* e *M. bracaatinga*, decidiu-se fazer um estudo comparativo entre as hemiceluloses destas duas angiospermas.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Métodos Gerais

2.1.1. Eletroforese

Como um critério de avaliação da pureza das frações polissacarídicas, empregou-se a eletroforese após prévia coloração química dos polissacarídeos com o corante Azul de Procion M-3G. (Cia. Imperial de Indústrias Químicas do Brasil), segundo o método de DUDMAN & BISHOP (27), observadas as seguintes condições: acetato de celulose (Cellogel), como suporte; tampão borato de sódio (ácido bórico 0,2 M mais borato de sódio 0,05 M), com pH ajustado para 9,2 com uma solução de NaOH diluída: diferença de potencial de 250 a 350 V e corrente de 7mA, tira de 2,3 x 16,5 cm sendo a eletroforese corrida em aparelho FANEM, com câmara de reversão CHEMETRON.

2.1.2. Cromatografias

2.1.2.1. Cromatografia em Papel (c.p.)

Foi realizada pelo método de desenvolvimento ascendente em papel Whatman nº 1 com os seguintes sistemas de solventes:

- a) BENZENO: n-BUTANOL:PIRIDINA:ÁGUA (1:5:3:3 v/v, fase superior)(36).
- b) ACETATO DE ETILA: ÁCIDO ACÉTICO: ÁCIDO FÓRMICO: ÁGUA (18:3:1:4) v/v fase superior.

O nitrato de prata alcalino (89) foi usado como visualizador de mono e oligossacarídeos.

2.1.2.2. Cromatografia em camada delgada (TLC)

As placas de sílica-gel (Merck, 20x20 cm, 0,25mm de espessura) foram desenvolvidas com os seguintes sistemas de solventes:

c) n-BUTANOL:ACETONA:TAMPÃO FOSFATO, pH = 5,0 (4:5:1 v/v);

d) ACETATO DE ETILA:ÉTER DE PETRÓLEO: CLOROFORMIO (3:3:1 v/v);

e) BENZENO:ETANOL:ÁCIDO ACÉTICO:ÁGUA (200:47:15:1 v/v).

O ácido sulfúrico a 5% em metanol (nebulização seguida de aquecimento a 110°C) foi usado para revelação dos derivados metilados de açúcares.

2.1.2.3. Cromatografia em fase gasosa

A determinação quantitativa de açúcares bem como o tipo das ligações glicosídicas presentes nos polissacarídeos foram efetuados por cromatografia gasosa em aparelho "VARIAN", modelo 24.440, equipado com detector de ionização de chama e usando-se nitrogênio como gás de arraste. Para os diferentes derivados de açúcares foram utilizados as seguintes colunas:

Coluna A: A análise de açúcares metilados na forma de metil glicosídeos foi feita segundo Stephen (83), usando colunas contendo 14% de p/p LAC-4R 886 sobre "chromosorb W" de 80-100 mesh (DMSC), em tubo de cobre de 100 x 0,4 cm (d. i.) a 150°C, com detector a 225°C e câmara de injeção a 205°C, com fluxo de nitrogênio a 25 ml/min.. A coluna foi operada isotermicamente. Os tempos de retenção relativos dos produtos de metanólise dos polissa-

carídeos metilados foram calculados em relação ao β -O-Me
til-2,3,4,6-Tetra-O-Metil-D-Glucopiranosídeo.

Coluna B: A quantificação de derivados acetilados, provenientes tanto de produtos de degradação de Smith (28,46,49), bem como dos produtos reduzidos após hidrólise de frações polissacarídicas, foi obtida pelo processo de SWARDEKER (85). Foram empregadas colunas contendo 3% de ECNSS-M sobre "Gás Chrom Q" de 100-120 mesh em tubo de aço inoxidável de 120 x 0,4 cm (d.i.) a 170°C com detector a 250°C. Para a análise dos produtos de degradação de Smith a coluna foi operada com temperatura programada (100-150°C, 10°/min).

Coluna C: Para análise de açúcares parcialmente metilados na forma de alditóis acetilados foi utilizada coluna contendo 3% de OV-225 sobre "Gás-Chrom Q", de 100-120 mesh, em tubo de aço inoxidável de 200 x 0,15 cm (d.i.), operada isotermicamente a 170°C.

Os tempos de retenção dos derivados parcialmente metilados e acetilados nas colunas B e C foram calculados em relação ao 1,5-di-O-Acetil-2,3,4,6-Tetra-O-Metil-D-Glucitol.

2.1.3. Polarimetria

As rotações óticas das frações polissacarídicas (1% em água), foram feitas em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 141, a 25°C e usando-se a banda D de sódio como fonte luminosa.

2.1.4. Determinações colorimétricas

2.1.4.1. Hexoses e pentoses totais:

Foram determinadas pelo método do fenol ácido sulfúrico (26), usando-se a D-Glucose e a D-Xilose como padrões, respectivamente, nos λ máximos de absorção de 490 e 480 nm.

2.1.4.2. Proteínas

Foram estimadas pelo método de Lowry (64), usando-se albumina sérica bovina como padrão.

2.1.4.3. Ácidos urônicos

A dosagem de ácido urônico, nas diferentes frações polissacarídicas foi feita pelo método de Carbazol (14), usando-se ácido D-Glucurônico como padrão.

2.1.4.4. Grupos O-Acetil

A determinação quantitativa do Grupo O-Acetil na fração H-DMSO, foi executada pelo método de Hestrin (25).

2.1.5. Outros procedimentos

A) Monitoramento de pH: A avaliação e o ajustamento do potencial hidrogeniônico foram efetuados em aparelho CLAMANN & GRALMERT MV 85 (Dresden), no caso de muita precisão. Nas análises roti-

neiras, utilizou-se o papel indicador "Universalindikator" pH 0-14 (MERCK).

- B) **Precipitações etanólicas:** A recuperação das frações polissacarídicas a partir de soluções aquosas ou salinas diluídas, bem como purificações parciais (por eliminação de contaminantes de baixo peso molecular), foram feitas pela adição da solução polissacarídica a 3 volumes de etanol. O precipitado foi removido por centrifugação, suspenso em água e dialisado contra água corrente durante 24 horas. Após diálise, o polissacarídeo foi recuperado através de nova precipitação etanólica e o precipitado foi então lavado sucessivamente com etanol a 96%, acetona e se cado ao ar.
- C) **Evaporações:** Foram realizadas em evaporador rotatório, a vácuo, a 40°C com exceção de produtos metilados, para os quais observou-se um limite não superior de temperatura de 25°C.
- D) **Hidrólises ácidas parciais e totais dos polissacarídeos:** foram realizadas com:
- a) Ácido trifluoracético (TFA) 0,5N a 100°C durante 5 horas. Após a hidrólise, o TFA foi eliminado por sucessivas adições de água e evaporações, como descrito em 2.1.5 - C (79).
 - b) Ácido sulfúrico 1N durante 5 horas a 100°C. para a neutralização utilizou-se a adição de carbonato de bário até pH 5,0, removendo-se o sulfato de bário resultante (79).
 - c) Ácido sulfúrico a 72% por 3 horas à temperatura ambiente, (pré hidrólise), seguindo-se uma diluição com água até concentração final de 4%, e aquecimento a 100°C por mais 2 horas (79).

2.2. MÉTODOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Tratamento inicial do material

O caule da angiosperma *Acácia molliissima* (*A. decurrens* Wills. var. *mollis* [Willd] Lindl.) (*A. adenophora* Spreng) (22) colhida em São Leopoldo, Rio Grande do Sul, foi descascado, estabilizado ao ar e triturado em moinho Wiley, empregando-se uma peneira de 60 mesh. A madeira moída foi submetida a uma extração no aparelho Soxhlet, com uma mistura de benzeno: etanol (2:1 v/v), por 72 horas para eliminação de pigmentos, lipídeos, açúcares livres e ceras. Em seguida, o resíduo seco, foi submetido a extração com uma solução de oxalato de amônio a 0,5 % a 85°C por 5 horas (77). Filtrou-se a vácuo em funil de Büchner, e o resíduo, após a segunda extração foi secado e extraído com água quente a 70°C por 8 horas. Filtrou-se e o resíduo foi submetido a uma extração com EDTA a 0,2% por 8 horas a 70°C, seguindo-se a filtração e secagem de resíduo final ao ar.

2.2.2. Extração e isolamento das hemiceluloses da *A. molliissima*

2.2.2.1. Extração com Dimetil sulfóxido (11, 17, 67)

A serragem (100 g), preparada conforme item 2.2.1, foi extraída com 1 litro de dimetil sulfóxido (DMSO), sob atmosfera de nitrogênio, a 60°C, por 72 horas. Após a extração, filtrou-se em placa porosa, lavando-se o resíduo com 100 ml de água quente. Os filtrados reunidos foram adicionados a 3 volumes de etanol, originando-se um precipitado. O precipitado foi redissolvido em água e diali-

sado contra água corrente por 24 horas. Após centrifugação para remoção das partículas insolúveis, a solução polissacarídica foi precipitada com 3 volumes de etanol. Após a lavagem com etanol e acetona, o precipitado foi seco a vácuo em aparelho de Abderhalden, obtendo-se 0,96 g de hemicelulose bruta, denominada de H-DMSO.

2.2.2.2. Extração com NaOH (93)

O resíduo da extração anterior foi reextraído com uma solução aquosa de NaOH 1N por 24 horas, em atmosfera de nitrogênio, à temperatura ambiente. A fim de proteger as unidades terminais redutoras, e impedir a degradação por β -eliminação ("peeling off"), adicionou-se NaBH_4 (50 mg). O extrato alcalino foi filtrado por sucção a vácuo, e o resíduo foi lavado com água. O extrato e a água de lavagem reunidos, foram imediatamente resfriados e acidificados, com ácido acético a 50% até pH 5,0, (10) precipitando assim, a hemicelulose A, que foi recolhida por centrifugação, lavada com água acidulada (3x), em seguida com etanol e depois com acetona. Após secagem em aparelho de Abderhalden, obteve-se 5,4g de hemicelulose A bruta.

Ao sobrenadante da precipitação da hemicelulose A combinado com as lavagens com a água acidulada foram adicionados 3 vols. de etanol, e o precipitado (hemicelulose B), foi recolhido por centrifugação. O precipitado foi redissolvido em água, dialisado e depois adicionado a 3 vols. de etanol. O precipitado, foi coletado por centrifugação, lavado com etanol, e depois com acetona e então seco em aparelho Abderhalden, produzindo 0,69 g de hemicelulose B bruta. Os itens 2.2.1. e 2.2.2. estão sumarizados no Esquema 1.

Amostras da Hemicelulose A e Hemicelulose B (10 mg), foram hidrolisadas com TFA 1N (2 ml) por 5 horas a 100°C, para posterior análise em Cromatografia gasosa (GLC), coluna B, (3,9,96) sob a forma de alditóis acetilados conforme indica a tabela 1.

2.2.3. Interação dos polissacarídeos com iodo de acordo com o método de Gaillard (37, 38, 39, 40, 41).

A hemicelulose A e H-DMSO (25 mg), foram solubilizadas em água (25 ml). Foram pipetadas, alíquotas de 0,2; 0,4; 0,6 ; 0,8; 1,0 ml, das soluções polissacarídicas, completando-se o volume para 10 ml, com uma solução de cloreto de cálcio 3,7 M, contendo 0,05% de iodo e 0,21% de iodeto de potássio. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as absorbâncias das soluções foram lidas a 610 nm (λ máximo de absorção para o complexo xilano-iodo), contra um branco preparado nas mesmas condições. Os gráficos foram traçados em função da absorbância versus concentração crescente de polissacarídeo, de acordo com a figura 1.

2.2.4. Filtração em gel da hemicelulose DMSO (12, 21)

A hemicelulose DMSO (20 mg), foi colorida com Azul de Procion M-3G (Cia. Imperial de Indústrias Químicas do Brasil), de acordo com o método de DUDMAN & BISHOP (27). Em seguida foi cromatografada em coluna (45 x 2,0 cm d.i.), contendo uma mistura de Sephadex G₁₀₀ mais G₂₀₀ (1:1), (5) e eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 3ml/hora. Frações de 1,5 ml, foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações Buchler Instruments), e absorbância determinada em espectrofotômetro Coleman Junior, Mod. 6A.

Os valores de absorbância a 605 nm versus volume de

elução, foram "plotados" conforme figura 2.

As frações correspondentes aos eluatos de 20-34,5 ml (Pico I) e de 38,5-48 ml (Pico II), foram individualmente reunidos, hidrolisados e analisados por GLC (coluna B), sob a forma de alditóis acetilados (Tabela II).

2.2.5. Oxidações das hemiceluloses A e H-DMSO, com periodato de sódio (33,46,48,50).

Amostras de Hemicelulose A e H-DMSO (50 mg), foram oxidadas com meta-periodato de sódio (0,05 M), na ausência de luz, à temperatura ambiente (46,49), durante 120 horas. Paralelamente foi feito um branco nas mesmas condições. A intervalos regulares de tempo foram retiradas alíquotas (1 ml), das hemiceluloses em oxidação e do branco para a contínua observação do consumo de meta-periodato, que foi pelo método de arsenito de sódio (28).

A liberação do ácido fórmico, foi determinada por titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,01N, sob atmosfera de nitrogênio e usando-se como indicador a fenolftaleína (57).

2.2.6. Degradação clássica do tipo Smith das hemiceluloses A e H-DMSO.

As hemiceluloses H-DMSO e A (50 mg), foram oxidadas com periodato de sódio, como anteriormente descrito. Após 120 horas de oxidação adicionou-se etileno glicol (1 ml), com a finalidade de interromper a reação e decompor o excesso de periodato de sódio. Após 30 minutos as soluções polialdeídicas foram dialisadas contra água corrente durante 24 horas e em seguida reduzidas com boroidreto de sódio (20 mg), durante 12 horas, à temperatura ambiente (1,44). O excesso de boroidreto foi decomposto com ácido acé-

tico a 30% e as soluções foram novamente dialisadas contra água corrente, para eliminação do ácido bórico e acetato de sódio. Em seguida, os dialisados foram concentrados à vácuo até secura e submetidos a hidrólise com uma solução de ácido sulfúrico 1N a 100°C por 5 horas. Os produtos hidrolisados, previamente neutralizados com BaCO₃, foram submetidos novamente a redução com boroidreto de sódio durante 12 horas. Após a redução o excesso de boroidreto de sódio foi decomposto com ácido acético a 30%. As soluções foram deionizadas com resina trocadora de íons (Dowex 50W-X8-200-400 mesh forma H⁺), filtradas e concentradas em evaporador a vácuo. O ácido bórico foi eliminado por sucessivas evaporações com metanol. Os alditóis foram acetilados com anidrido acético, piridina e posteriormente analisados por GLC, na coluna B (Tabela III).

2.2.7. Análise por metilação das hemiceluloses A e H-DMSO (15,16,66, 86).

As frações de Hemicelulose A e H-DMSO (100 mg), foram metiladas (2x) pelo processo de HAWORTH (51) e pelo método de HAKOMORI (47), (2x). Após diálise, os produtos metilados foram extraídos com clorofórmio e evaporados até completa secura, sob pressão reduzida e a 30°C.

Uma amostra metilada de Hemicelulose A (10 mg) foi tratada, em tubo selado, com metanol anidro contendo 3,8% de gás clorídrico (1 ml), a 100°C por 6 horas. A solução metanolizada foi neutralizada com carbonato de prata, e a mistura de metil glicosídeos foi analisada por GLC (coluna A), conforme Tabela IV.

Amostras de Hemicelulose A e H-DMSO metiladas (20 mg), foram hidrolisadas com ácido fórmico a 90% (10 ml) por 1 hora a 100°C. O ácido foi eliminado por concentração a vácuo, e os resíduos, foram re-hidrolisadas com uma solução de ácido sulfúrico 0,25M

(1 ml) a 100°C, por 16 horas. Os hidrolisados foram convertidos em alditóis acetilados (13, 15, 96), e analisados por GLC (colunas B e C como indicam as Tabelas V e VI.

2.2.8. Hidrólise ácida parcial das hemiceluloses A e DMSO (8, 13, 23, 66).

A hemicelulose A (1 g) e a hemicelulose DMSO (0,5g), da *A. mollissima*, foram submetidas a hidrólise parcial com ácido sulfúrico 1N, em refluxo por duas horas. A neutralização realizou-se com uma solução de carbonato de bário em agitação magnética até pH 5,0. Filtrou-se em funil de placa porosa "F". Concentrou-se o filtrado reduzindo-o a um pequeno volume e aplicou-o numa coluna (6 x 2,0 cm) de Dowex Ag-1 x 10, forma acetato (200-400 mesh), com a finalidade de separar açúcares ácidos dos neutros. Seguiu-se a eluição dos açúcares neutros com água (300ml), e a eluição dos açúcares ácidos foi então realizada com ácido acético a 30% (500 ml). Os eluatos ácidos foram concentrados até a secura, seguindo-se adições de água e sucessivas evaporações a vácuo para a completa eliminação do ácido acético residual.

Os oligossacarídeos foram separados por cromatografia em papel Whatman nº 1 solvente b (62, 65, 79, 92). O ácido aldobiurônico ($R_{x11} = 0,714$) foi isolado empregando cromatografia preparativa em papel Whatman nº 3 MM e o solvente acima citado.

O aldobiurônico (2,0 mg) foi convertido em metil ester-D-metil-glicosídeo por tratamento com metanol anidro contendo 3,8% de gás clorídrico (2 ml), por 8 horas e o grupamento carboxílico esterificado foi então reduzido com boroidreto de sódio. Após

deionização. O produto foi hidrolisado com ácido sulfúrico 0,5 M por 5 horas a 100°C. Os hidrolisados foram analisados em GLC, na forma de alditóis acetilados (coluna B), conforme da Tabela VII.

Outra amostra do ácido aldobiurônico (5,0 mg), foi metilada pelo processo de Hakomori (47), o dissacarídeo metilado foi carboxi-reduzido com boroidreto de sódio em metanol e então permetilado. O produto metilado foi hidrolisado com ácido sulfúrico, 0,5 M a 100°C por 5 horas e os açúcares metilados foram analisados na forma de alditóis acetilados por GLC (colunas B,C).

O eluato ácido correspondente a hidrólise ácida parcial da hemicelulose DMSO, foi metilado (Hakamori), carboxi-reduzido e remetilado. O produto resultante foi hidrolisado com ácido sulfúrico 0,5M a 100°C por 5 horas e analisado por GLC, (coluna B e C) conforme indica a Figura 5.

2.2.9. Degradação da Hemicelulose A acetilada (63, 70)

A hemicelulose A da *A. mollissima*, foi degradada conforme o processo descrito por LINDBERG (63).

O polissacarídeo (50 mg) foi solubilizado em formamida (10 ml) e adicionou-se piridina-anidrido acético 1:1 (5 ml). Deixou-se reagir durante 15 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura reagente foi misturada com água gelada e dialisada contra água corrente. O processo foi repetido por mais de uma vez e o polissacarídeo acetilado resultante foi secado a vácuo a 30°C.

O polissacarídeo acetilado foi dissolvido em anidrido acético (10 ml), misturado com trietilamina (10 ml), e a mistura reagente mantida a 100°C durante 2,5 horas. Em seguida os reagentes foram evaporados a vácuo, até completa secura

e o resíduo foi tratado com ácido acético a 90% (5 ml), durante 2 horas, a 100°C. Após resfriada, a mistura foi dialisada contra água corrente, durante 24 horas e evaporada a vácuo. O resíduo foi secado em aparelho de Abderhalden.

O polissacarídeo modificado (20 mg) foi metilado pelo Método de Hakomori (47) (2 vezes) e os açúcares metilados foram analisado por GLC, sob a forma de alditóis acetilados (colunas B e C), conforme Tabela IX.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O caule de *A. mollissima* (*A. decurrens* Willd. var . *mollissima* [Willd] Lindl) - (*A. Adenophora* Spreng), após tritura-mento em moinho de Wiley, foi extraído com uma mistura de Benzeno: etanol para remoção de pigmentos, ceras e lipídeos. Em continuação, o resíduo seco foi tratado com uma solução de oxalato de amônio 0,5%, EDTA e água quente, com a finalidade de eliminar substâncias péc-ticas. Esta eliminação se faz necessária dada a natureza, em parte, comum dos monossacarídeos presentes em frações péc-ticas e hemicelulósicas (p. ex., xilose, ácidos urônicos, etc). Solubiliza-dos os componentes péc-ticos com o auxílio de quelantes, ficou o ma-terial residual em condições de prover as frações hemicelulósicas, já numa forma mais purificada (30).

O resíduo anteriormente tratado foi submetido às ex-trações com DMSO e posteriormente com uma solução de NaOH 1N, ob-tendo-se as frações das hemiceluloses H-DMSO, A e B, conforme indi-ca a Figura 1. Os resultados das análises destas frações polissaca-rídicas encontram-se sumarizados na Tabela I.

Sabe-se que a extração direta com álcalis facilita:

1. um rendimento de 80-85% de xilanos nas hemiceluloses mesmo sem as mesmas terem sido submetidas a uma prévia delignificação (88).
2. levando-se em consideração que o processo da delignificação pré-
via facilita a extração alcalina e a obtenção da hemicelulose ,

convém por outro lado salientar as desvantagens que ele produz como: oxidação até grupos ácidos nos pontos em que se ligam covalentemente com a lignina (95). Conclui-se portanto, que é muito difícil a extração de hemiceluloses intactas e ainda mais, obter-se uma idéia verdadeira da composição polissacarídica da parede celular vegetal nativa.

As análises das frações de hemiceluloses A, B, e H-DMSO, encontram-se indicadas na Tabela I e demonstram que as hemiceluloses A e B eram constituídas quase que inteiramente de unidades de D-xilose, menor quantidade de D-Glucose e ácido urônico, enquanto que a H-DMSO extraída em primeira etapa, em condições suaves era constituída por unidades de D-glucose e D-xilose e mais traços de L-Arabinose, D-Manose e D-Galactose sem contudo apresentar ácido urônico na sua constituição. Ademais, contém ainda um composto não identificado, de natureza não glicídica, conforme se pode constatar através da Figura 5.

O teor de proteína como determinado pelo método de Lowry et al., (64) pode, pelo menos em parte, englobar também componentes do tipo lignina, posto que um material desta natureza (lignina resultante de tratamento com ácido forte da Hemicelulose A da *M. bracaatinga* (72)) analisado nas mesmas condições deu reação fortemente positiva com reativo de Folin.

Assumindo o composto dosado como proteína, tratou-se a H-DMSO com TCA a 10% final, na tentativa de fracionar o componente protéico no ppt. e a(s) Hemicelulose(s) no sobrenadante. As percentagens de carboidrato totais recuperadas como TCA - solúvel (20%) e TCA-precipitada (80%) não permitiram interpretações conclusivas, posto que o conteúdo "protéico" permaneceu aproximadamente constante neste fracionamento. O achado motiva então uma deta-

lhada reinvestigação da ocorrência de possíveis complexos proteoglicanos (58), ou ligno-glicanos na fração extraída com DMSO (61).

Ficou então evidenciada a conveniência no esquema extrativo, da etapa inicial de extração com o solvente aprótico, seletivo para a remoção de uma população polissacarídica heterogênea de caráter não ácido e , portanto diferenciada das hemiceluloses extraídas em condições alcalinas, exceto por uma pequena contaminação da hemicelulose A ou B (Figura 2).

As análises por eletroforese em papel acetilado (Cellologel), indicaram a presença de uma única banda para a hemicelulose A. A fração H-DMSO apresentou, além de uma banda principal, pequena contaminação posteriormente confirmada pela filtração em gel de Sephadex $G_{100} + G_{200}$ (Figura 2). A análise das bandas separadas indicaram que esta contaminação (Banda II, Figura 2), pode ser atribuída à presença de pequenas quantidades de hemicelulose A ou B nesta fração polissacarídica, conforme indica a Tabela II. Os dados obtidos, entretanto, não excluem a possibilidade de que esta fração seja constituída de mistura de xilano e glucano.

As rotações específicas $[\alpha]_D^{25} = -41,00^\circ$ e $[\alpha]_D^{25} = +35^\circ$, respectivamente encontradas para as hemiceluloses A e H-DMSO, sugerem uma configuração β para as unidades de D-Xilose e α para as unidades de D-Glucose.

As frações hemicelulósicas H-DMSO encontram-se no estado nativo, parcialmente acetiladas, conforme indicam a Tabela 1, contendo cerca de 3,14% de grupos O-Acetil, o que combinado com a ausência de açúcares ácidos pode explicar sua solubilidade em solvente orgânico (DMSO).

Por intermédio da hidrólise ácida parcial da hemicelulose A, isolou-se a mistura de ácidos aldobiurônicos constituí-

dos de ácido 4-O-Metil-D-Glucurônico-Xilose, ácido glucurônico-Xilose, (conforme indica os dados da Tabela VII). Os resultados demonstram ainda proporções equimolares para os ácidos 4-O-Metil-D-Glucurônico e o D-Glucurônico (Tabela VII). Os ácidos aldobiurônicos foram isolados por cromatografia preparativa em papel, metilados, carboxi-reduzidos e analisados em GLC na forma de alditóis acetilados, após hidrólise conforme indica a (Tabela VIII).

A presença de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol e 3,4-di-O-metil-D-xilitol indica ligação glicosídica do tipo 1-2, entre as unidades de ácido urônicos e a xilose.

A hemicelulose DMSO, confirmando a natureza neutra, não apresentou na sua constituição a presença de ácido aldobiurônico.

Polissacarídeos lineares apresentam o fenômeno da complexação com o iodo, desenvolvendo uma coloração azul intensa quando dissolvidos em cloreto de cálcio de acordo com o método de Gaillard (37, 38, 40, 41).

O mais importante fator na interação do polissacarídeo com o iodo é que as unidades dos polissacarídeos estejam interligadas através das ligações glicosídicas do tipo (1 → 4) e que seja um polissacarídeo pouco ramificado.

As intensidades de interação entre os polissacarídeos e iodo é proporcional à linearidade das cadeias, diminuindo pois com o grau de ramificação. É importante ressaltar que para se desenvolver uma reação positiva com o iodo, a cadeia principal ou ramificação do polissacarídeo precisa apresentar uma espiral com pelo menos seis resíduos de açúcares interligados através da ligação (1 → 4).

Não é definitiva a natureza dos açúcares que consti-

tuem a cadeia principal do polissacarídeo linear, podendo esta cadeia ser constituída de açúcares como a β -D-xilose e α -D-Glucose interligados por ligação tipo (1 \rightarrow 4), os quais reagem positivamente com o iodo, isto porque existe uma semelhança configuracional dos referidos açúcares em torno do C-4.

Na figura 1 comparou-se as absorbâncias das hemiceluloses A (I) e H-DMSO (IV) da madeira da *Mimosa bracaatinga* e as Hemiceluloses A (II) e H-DMSO (III) da *A. mollissima*. Observou-se a variação da absorbância a 610 nm em relação à concentração crescente dos respectivos polissacarídeos obedecendo a faixa de linearidade da lei de LAMBERT BEER. Verificou-se que as hemiceluloses guardavam entre si um progressivo grau de ramificação, isto é : I < II < III < IV . De acordo com o conceito de Gaillard, a hemicelulose A da *Mimosa bracaatinga*, apresentou menor grau de ramificação, seguindo-se as hemiceluloses A e H-DMSO da *A. mollissima*, e por último a hemicelulose DMSO da *Mimosa bracaatinga*. Entretanto, de acordo com Oliveira (69) a hemicelulose DMSO da *M. bracaatinga*, não forma um complexo com o iodo devido a elevada proporção de grupos O-Acetil e não propriamente devido a ramificação da hemicelulose, posto que a mesma, após desacetilação por saponificação, formou facilmente o complexo.

As hemiceluloses A e H-DMSO, foram oxidadas com meta-periodato de sódio, na ausência de luz e à temperatura ambiente. Até 48 horas a hemicelulose A apresentou um consumo de 1,17 moles de periodato por mol de pentose anidra.

A liberação de ácido fórmico das hemiceluloses A e DMSO, após 120 horas foi determinada por titulação com uma solução de NaOH 0,01N, conforme seção 2.2.5, obtendo-se 0,135 e 0,18 moles de ácido fórmico por mol de pentose anidra, respectivamente.

Utilizando-se o processo da degradação de SMITH para a análise da estrutura da hemicelulose A e depois transformando os produtos em alditóis acetilados para serem analisados em GLC, ob-

teve-se como resultado os seguintes constituintes: Etileno glicol (37,6%); Glicerol (43,41%); Xilitol (19,00%). Resultados estes que discutiremos a seguir, levando em conta a Figura 3A.

- a) Considerando-se uma molécula linear e p.m. médio típico de xilanos (50 a 100) unidades de açúcar, pouca contribuição à natureza e percentagem de álcoois derivados resultaria do resíduo terminal redutor nativo (transformado na extração em xilitol) ou do único resíduo final não redutor. A participação mais importante destes dois extremos seria na produção de ácido fórmico.
- b) O item a, poderia ser mais significativo, se parte do xilitol recuperado na degradação de SMITH fosse decorrente de pontos de bloqueio parcial que formassem a molécula realmente ramificada; (por exemplo, segmentos β -(1 \rightarrow 4) principal com novas ramificações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 2) resultantes de ligações no carbono 3 e carbono 2 na cadeia principal.
- c) Quanto à contribuição do ácido urônico, surgem duas possibilidades, posto que a análise de ácidos aldobiurônicos (Tabela VII) sugere que duas variantes destes substituintes encontram-se ligados à cadeia principal; ou seja: o ácido glucurônico (GLU) e seu derivado o ácido 4-O-Metil-Glucurônico (4-O-M-GLU).
 - c.1) No primeiro caso (GLU), cada resíduo consumirá 2 moles de IO_4^- , liberando 1 mol de ácido fórmico.
 - c.2) No segundo caso (4-O-M-GLU), o bloqueio reduzirá o consumo de IO_4^- à proporção equimolar, sem liberação de ácido fórmico.

A Figura 3A facilita a compreensão no sentido de como cada produto é originado na análise da degradação de Smith a partir da molécula polissacarídica nativa.

O consumo de periodato da hemicelulose DMSO apresentou um resultado anômalo (0,036 moles de periodato por mol médio de açúcar anidro), muito inferior ao esperado, o qual deveria ser pelo menos superior a 1 mol/mol médio de açúcar anidro. Entre os produtos da degradação tipo Smith foram identificados maior pro-

porção de etileno glicol, Glicerol e Treitol e, em menor quantidade, xilitol e glucitol resistentes, conforme evidencia a Tabela III.

A metilação é um método de irrefutável valor na determinação estrutural de um polissacarídeo, embora existam vários outros métodos que ajudam a elucidar este tipo de estrutura, por exemplo, a oxidação com o periodato. A metilação é ainda vista como um dos métodos mais importantes empregados nos dias atuais.

O polissacarídeo metilado é analisado na forma de metil éter-O-metil-glicosídeos ou na de metil alditóis acetilados, em GLC (coluna A, B,C), conforme indica nas tabelas: IV, V e VI, relacionando os tempos de retenção aos respectivos padrões: β -O-Metil-2,3,4,6-Tetra-O-Metil-D-Glucopiranosídeo e 1,5-Di-O-Acetil-2,3,4,6-Tetra-O-Metil-D-Glucitol.

A hemicelulose A metilada, apresentou como resultado uma alta percentagem de 2,3-di-O-Metil-D-Xilitol (85,5%), o que sugeriu tratar-se de um xilano constituído de unidades de D-xilose interligado por ligação do tipo (1 \rightarrow 4). Esta ligação foi também confirmada pela complexação deste polissacarídeo com o iodo.

A significativa proporção de monometil D - Xilitol (8,3%), sugere a existência de ramificações ou alternância na cadeia principal β -(1 \rightarrow 4) por:

- a) resíduos com ácido urônico, em C-2;
- b) bloqueio do C-3 da cadeia de xilose por grupamentos de lignina ou mesmo xilose.
- c) intercalação de ligação (1 \rightarrow 3) na cadeia poli- β -(1 \rightarrow 4).
- d) uma metilação incompleta ou demetilação.

A presença do 2,3,4-tri-O-metil-D-xilitol (0,9%), corresponde ao grupo final não redutor. Desta forma se o xilano apre

sentasse um D.P. da ordem de 100 e se fosse linear, (no que respeita a composição em xilose) este dado seria perfeitamente compatível (Figura 3). Por outro lado este baixo percentual minimiza a possibilidade de ramificações singulares por xilose inserida na cadeia principal, pois esta daria o referido derivado trimetilado. Para um D.P. da ordem de 50, a referida percentagem já justificaria a existência de pelo menos uma destas ramificações na molécula de xilano.

As unidades de ácido urônico geralmente são encontradas nas hemiceluloses ligadas glicosidicamente à cadeia principal do xilano, no carbono 2 das unidades de D-xilose (6,88,94). A presença do 3-O-Metil-D-xilopiranosídeo entre os produtos da metanólise da hemicelulose A de *A. mollissima* (Tabela IV), indica a possibilidade de bloqueio simultâneo a C-2 e a C-4 das unidades de D-xilopiranoses.

Como a análise do aldobiurônico demonstrou a ligação do ácido urônico a C-2, a presença do 2-O-Metil-xilopiranosídeo pode ser atribuída à de metilação, a ramificações por xilose em C-3 daqueles resíduos que não tem ácido urônico ou por ligações a lignina ou ainda devido à presença de ligação (1 → 3), na cadeia do xilano. Como a percentagem de ácido urônico é de apenas 5%, uma ramificação em C-2 por xilose é também teoricamente possível.

A hemicelulose DMSO metilada, (Tabela VI) foi analisada em GLC sob a forma de metil alditóis acetilados e apresentou como resultado um alto teor de 2,3-Di-O-Metil-D-xilitol (24,00 % col. B e 25,41% col. C) e 2,3,6-Tri-O-Metil-D-Glucitol (49,79% col. B e 54,69% col. C), indicando predominância das ligações do tipo (1 → 4) para as unidades de xilopiranoses e glucopiranoses.

Na hidrólise ácida parcial seguida de separação em resina aniônica AG1-X10-Forma acetato, (200-400 mesh), não foi

detectado a presença de ácido urônico no eluato ácido, porém foi identificado por GLC, na forma de produto reduzido e acetilado um componente com $R_T = 5,77$ na coluna B, Figura 5. O comportamento cromatográfico deste componente, justifica-se pela natureza química da porção aglicônica do tipo lignina, quer por sua hidrofobicidade (59) quer pela presença do grupamento acídico, (por exemplo, ácido cumárico) (32). Ele foi também detectado na hemicelulose A da *M. bracaatinga* e posteriormente identificado como monômero de lignina (72, 98).

Os dados de metilação, oxidação com periodato e Degradação de Smith, entretanto, não são suficientes para a determinação da estrutura desta fração polissacarídica, mormente tratando-se de heteropolímero. A sua estrutura será posteriormente reanalisada por técnicas de fragmentação parcial por hidrólise ácida e enzimática, possibilitando assim a análise dos oligossacarídeos resultantes.

A hemicelulose A de *A. mollissima*, previamente acetilada conforme seção 2.2.9, foi submetida a uma degradação seletiva, com a eliminação das unidades dos resíduos dos ácidos urônicos existentes na macromolécula.

A referida fração foi posteriormente metilada e analisada através de GLC, na forma de seus alditóis acetilados. Observou-se a existência de um alto teor do componente 2,3-Di-O-Metil-D-Xilitol como elemento principal, e do aparecimento do 2,4-Di-O-Metil-D-Xilitol, não detectado na metilação do polissacarídeo original (Tabela IX). Os resultados sugerem a possibilidade de que a parte das ligações glicosídicas predominantes do tipo β -(1 \rightarrow 4), ocorram também algumas ligações β -(1 \rightarrow 3).

Observou-se também um aumento nas proporções do 2,3-Di-O-Metil-D-Xilitol de 85,48% no polissacarídeo original para

92,14% no polissacarídeo modificado. Por outro lado verificou-se uma diminuição do 3-O-Metil-D-Xilitol de 8,31% na forma original para 1,5%, na forma modificada. Estes resultados corroboram a presença de ácido urônico ligado a C-2 das unidades de D-xilose na cadeia de xilano (Figura 4).

Os resultados até aqui obtidos foram suficientes para se ter uma idéia de algumas diferenças entre as correspondentes frações hemicelulósicas isoladas do caule da *A. mollissima* e da *M. bracaatinga*. As principais diferenças notadamente de natureza estrutural são:

- as hemiceluloses da *M. bracaatinga* contêm apenas unidades de 4-O-Metil-D-Glucurônico ligadas à cadeia de xilano na posição 2. Enquanto que a hemicelulose A da *Acácia mollissima* apresenta quantidades equimolares do ácido glucurônico e do 4-O-Metil-D-Glucurônico.

- a fração DMSO da *M. bracaatinga* é um xilano com elevada percentagem de grupos O-Acetil (20 a 22%), enquanto que a correspondente fração na *Acácia mollissima* é constituída de um gluco-xilano com baixo teor de grupos O-Acetil (3,14%).

Experiências complementares posteriores deverão ser efetuadas com a finalidade de elucidar de uma maneira mais satisfatória a natureza estrutural destes polímeros.

TABELAS E GRÁFICOS

Esquema I

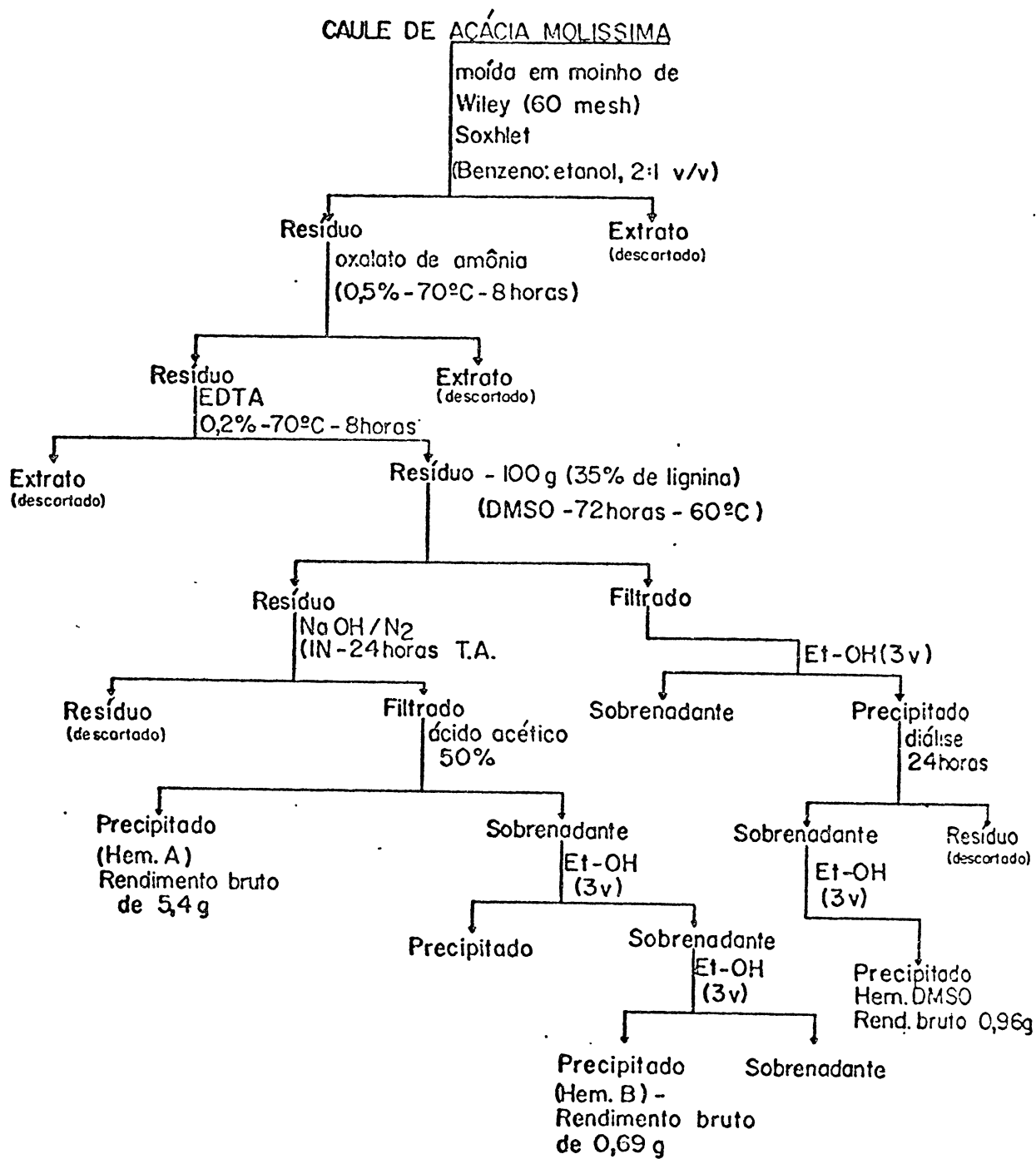


Tabela I - Análises das frações polissacarídicas existentes nas hemiceluloses A,B e H-DMSO da *Acácia mollissima*.

Frações	Rendimento %	Carboidrato Total (g%) (Hexoses e pentoses)	Grupos O-Acetil g%	$[\alpha]_{25}^D$	Proteínas mg% ¹	Proporção percentual de Açúcares componentes (%) ²					Ácido Urônico %
						L-ara	D-xyl	D-man	D-Gal	D-Glu	
A	5,4	4,2	-	-41°	0,7	0,2	88,00	-	-	6,8	5,00
B	0,69	0,47	-	-	-	2,28	73,00	2,41	0,95	15,36	6,00
H-DMSO	0,96	0,43	3,14	+35°	12	1,45	35,36	0,75	4,11	58,54	-

¹ Aliquotas com 1 mg de açúcares totais.

² G.L.C. dos alditois (coluna B).

Tabela II - Análise por GLC dos alditóis acetilados derivados das frações I e II da H-DMSO filtrada na coluna de sephadex G₁₀₀ + G₂₀₀.

FRAÇÕES	Alditóis Acetilados (Proporção Relativa %)			
	Arabinitol	Xilitol	Galactitol	Glucitol
I ^a	3,73	18,76	4,25	73,25
II ^b	-	92,69	-	7,30

^a Frações correspondentes ao eluato de 20 a 34,5 ml (Figura 2).

^b Frações correspondentes ao eluato de 38,5 a 48 ml (Figura 2).

Tabela III - Produtos resultantes da degradação tipo Smith das hemiceluloses: A e H-DMSO.

FRAÇÕES (hemiceluloses)	Produtos ^a				
	Etileno Glicol	Glicerol	Eritritol ou Treitol	Xilitol	Glucitol
A	++++	++++	-	+	-
DMSO	++++	++++	++++	++	+

^aGLC de alditois acetilados (coluna B).

Tabela IV - Análise por GLC dos produtos de metanólise da hemicelulose A metilada.

O-Metil Glicosídeos ¹	T ²	Avaliação Proporção qualitativa
2,3,4-Tri-O-metil-D-xilosídeo	0,76	+
3,4-di-O-metil-L-ramnosídeo	1,13	+
2,3-di-O-metil-D-xilosídeo	1,83 _m ; 2,00 _{fr} ; 2,26 _f	+++++
Ácido 2,3,4-Tri-O-metil-D-Glucurônico	3,33; 3,83	+
3-O-metil-D-xilosídeo	5,33; 8,67	+
2-O-metil-D-xilosídeo	6,4 ; 10,00	+
Não identificado	7,20	+
Não identificado	13,30	+++

¹Na forma de metil éter-O-metil-glicosídeo

²Tempos de retenção relativos ao β-O-metil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucopiranosídeo (coluna A)
f = forte; m = moderado; fr = fraco

Tabela V - Análise por GLC dos produtos de hidrólise ácida da hemicelulose A metilada, na forma de seus respectivos alditóis acetilados.

Alditóis	T ¹ (Coluna c)	Proporção relativa
		(%)
2,3,4-Tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	0,53	0,9
3,5-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	1,03	1,5
2,3 ou 3,4-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	1,19	85,5
(2 ou 3) Mono- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	2,23	8,3
4,6-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	3,43	0,94
3,6-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	3,9	0,92

¹ Tempos de retenção relativos ao padrão 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

Tabela VI - Análise por GLC dos produtos de hidrólise ácida da hemicelulose DMSO metilada, na forma de seus alditóis acetilados.

Alditóis acetilados	T ¹		Proporção relativa (%)	
	coluna C	coluna B	coluna C	coluna B
2,3,5-Tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -arabinitol	0,44	0,42	1,06	0,5
2,3,4-Tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	0,58	0,55	0,90	1,32
Composto não identificado	-	0,84	-	2,10
2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	1,016	1,00	5,51	5,19
2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -galactitol	-	1,24	-	2,24
2,3 ou 3,4-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	1,217	1,55	25,41	24,00
(2 ou 3)-Mono- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	-	2,82	-	1,00
2,4,6-tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	-	1,89	-	2,85
3,4,6-tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	1,838	-	0,53	-
2,3,6-tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	2,36	3,05	54,69	49,79
2,6-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	3,185	-	0,93	-
2,3-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	4,53	-	-	4,31
2- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	6,56	-	2,66	-
4,6-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	-	4,15	-	2,45
2,4-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -galactitol	-	6,07	-	4,59
3,4-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -galactitol	-	6,99	-	2,87

¹ Tempos de retenção relativos ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-Metil-D-Glucitol.

Tabela VII - Análise por GLC dos ácidos aldobiurônicos das hemicelulose A da *Acácia mollissima*, carboxi-reduzidos, na forma de seus respectivos alditóis acetilados após hidrólise.

Alditóis	T ^a	Proporção relativa
		(%)
Arabinitol	1,00	3,96
Xilitol	1,58	60,09
4- <u>Q</u> -metil- <u>D</u> -Glucitol	3,70	18,89
Glucitol	4,51	17,08

^aTempo de retenção relativo ao arabinitol penta acetato (coluna B).

Tabela VIII - Análise por GLC do aldobiurônico da hemicelulose A da *Acácia mollissima* metilado, carboxi-reduzido, remetilado na forma de alditóis acetilados, após hidrólise.

Alditóis	T ^a	Proporção relativa
		(%)
2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	1,00	50,44
3,4-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	1,54	49,56

^aTempos de retenção relativos ao padrão 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

Tabela IX - Análise por metilação da hemicelulose A original e modificada.

Alditois acetilados	Hemicelulose A - Metilada		Hemicelulose A - Modificada	
	T ^a (coluna C)	Proporção relativa (%)	T ^a (coluna C)	Proporção relativa (%)
2,3,4-tri- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	0,53	0,9	0,59	6,06
2,4-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	-	-	1,06	0,20
3,5-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	1,03	1,5	-	-
2,3-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	1,19	85,5	1,21	92,14
3- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -xilitol	2,23	8,3	2,15	1,55
Composto não identificado	1,54	1,2	-	-
4,6-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	3,43	0,94	-	-
3,6-di- <u>O</u> -metil- <u>D</u> -glucitol	3,9	0,92	-	-

^aTempos de retenção relativos ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

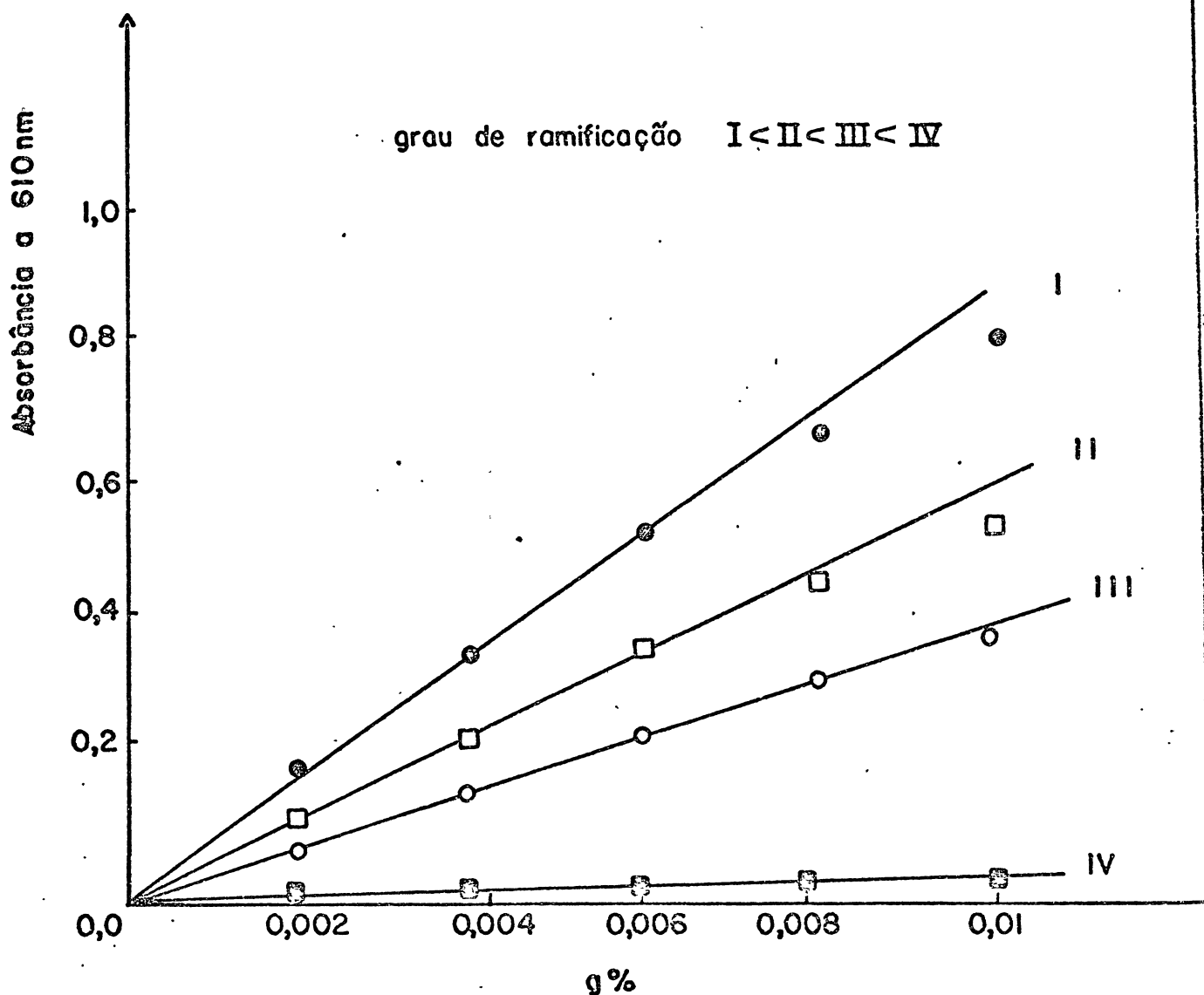


Fig. 1 - Complexação das hemiceluloses A e H-DMSO com iodo.

As absorbâncias foram medidas a 610 nm com concentrações crescentes de polissacarídeo em cloreto de cálcio 3,7M , contendo 0,05% de iodo e 0,21% de iodeto de potássio.

I) Hemicelulose A da *Mimosa bracaatinga* (Correia et al. (30); II) Hemicelulose A da *A. mollissima*; III) Hemicelulose DMSO de *A. mollissima*; IV) Hemicelulose DMSO da *M. bracaatinga*.

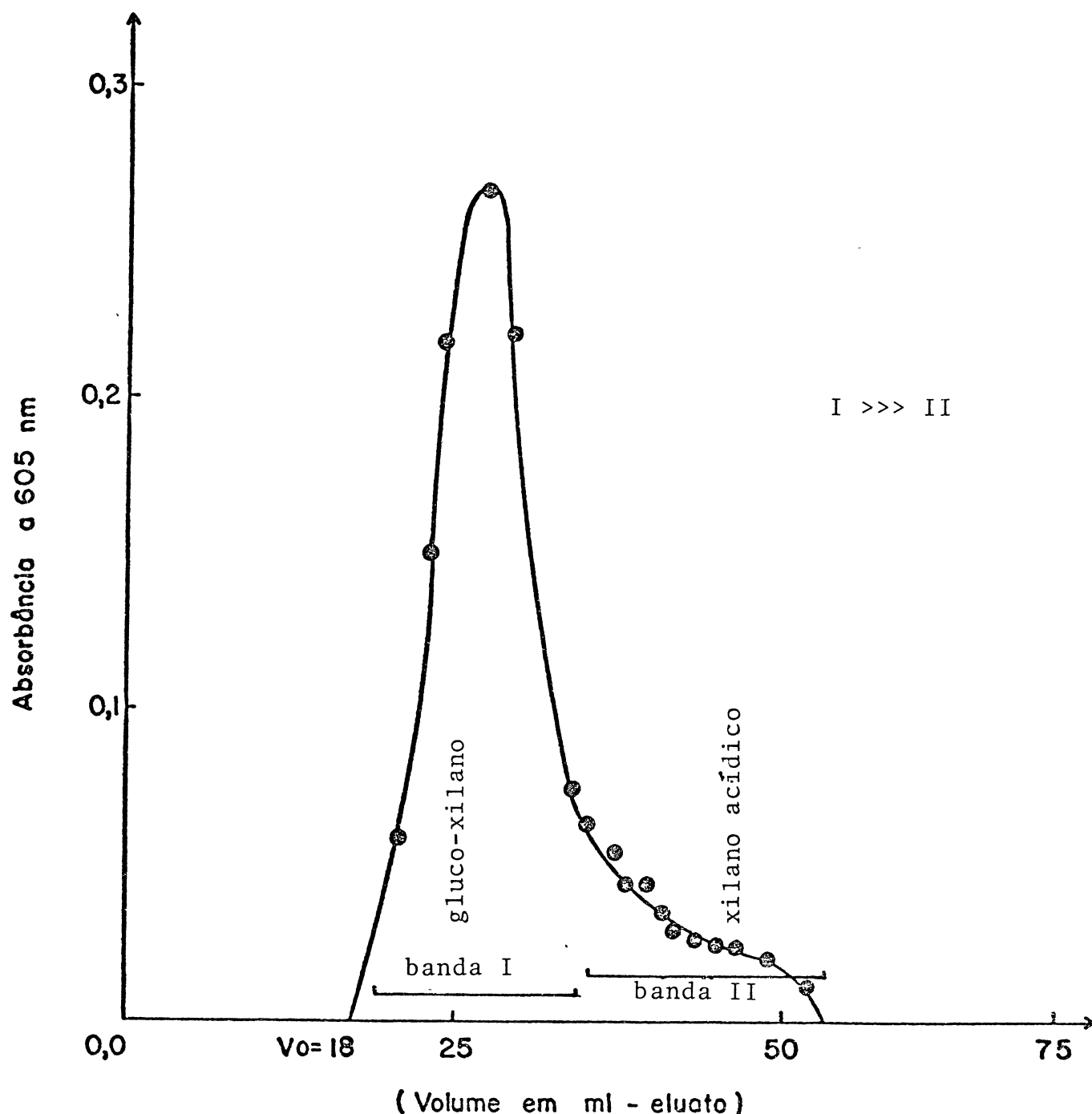
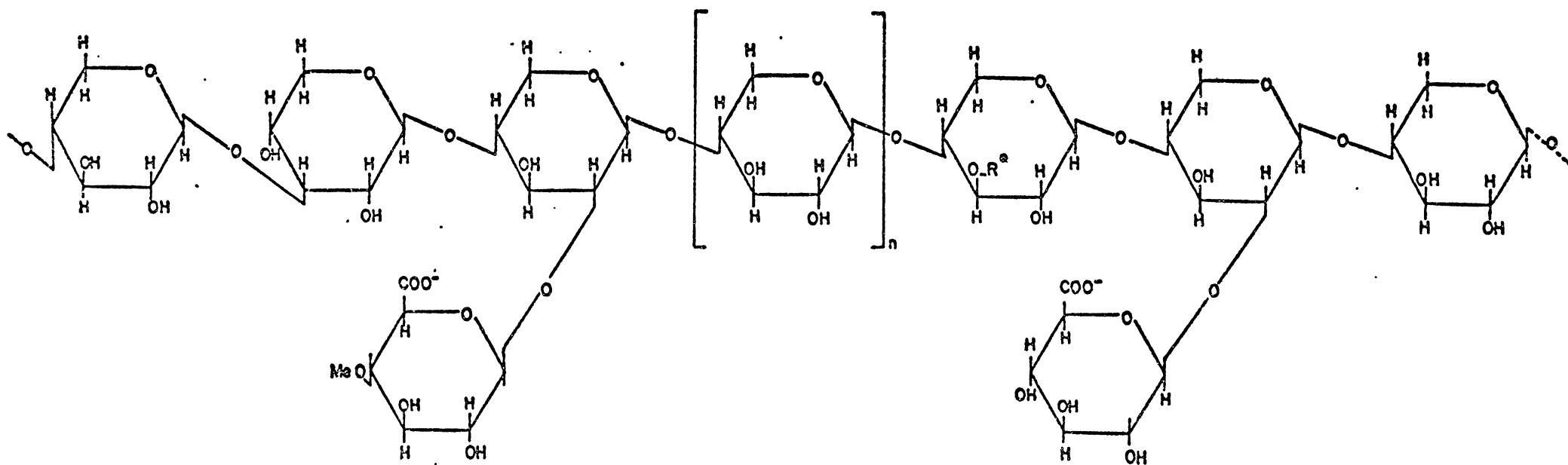


Fig. 2 - Filtração em gel da hemicelulose H-DMSO.

A cromatografia do polissacarídeo foi realizada em coluna contendo a mistura de Sephadex G-100 e G-200 (1:1) (45 x 2 cm). Frações de 1,5 ml foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações Buchler Instruments), com a velocidade de escoamento de 3 ml/hora. De cada tubo foi retirada uma alíquota de 0,2 ml para determinação do açúcar total, (método fenol sulfúrico). O polissacarídeo foi eluído nos volumes de 20 a 50 ml de eluato, com pico máximo no volume de 28,3 ml.



* R = Xilose, lignina.

Figura 3 - Possível estrutura da Hemicelulose A da *A. mollissima*.

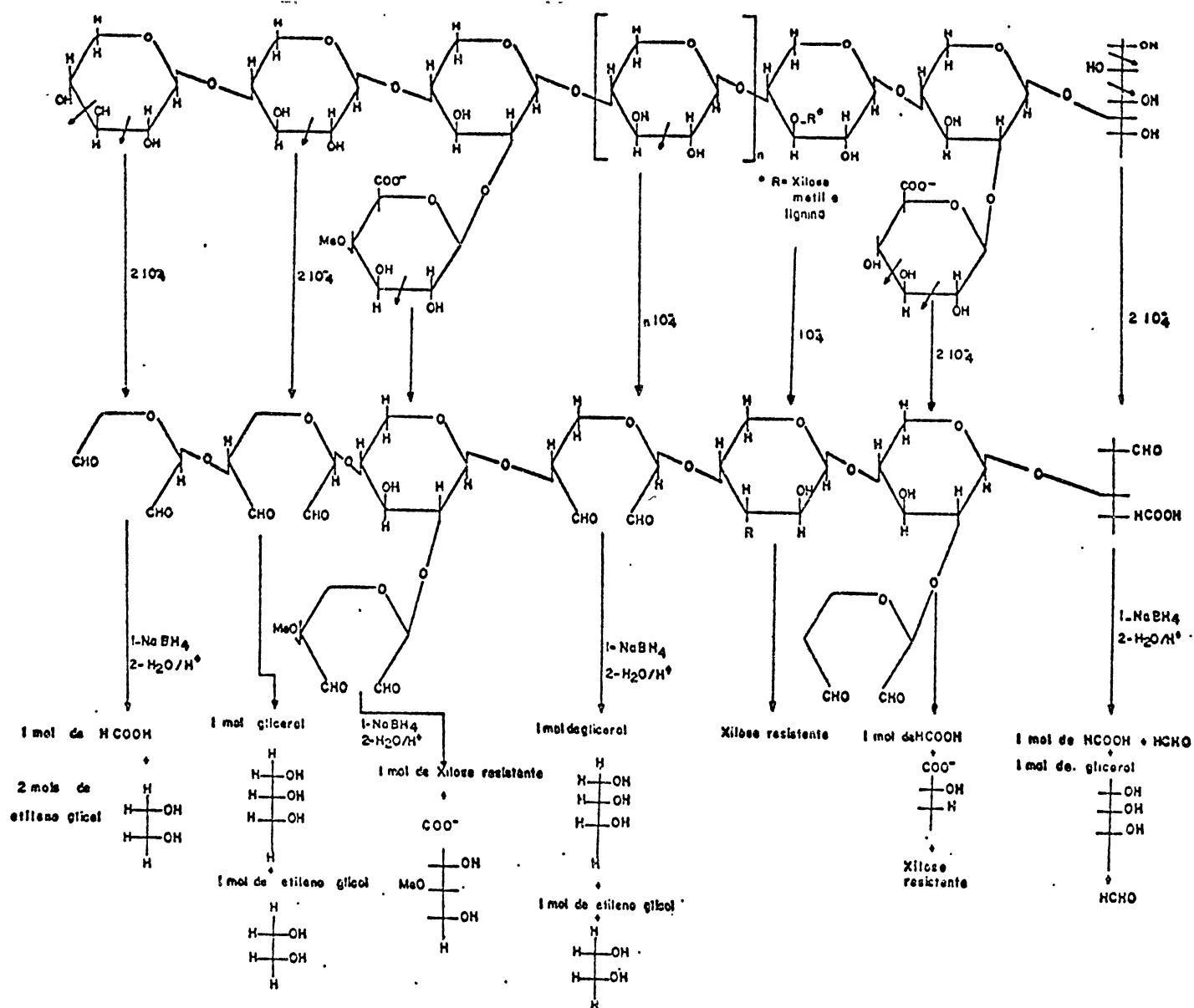


Figura 3A - Degradação tipo Smith da Hemicelulose A da *A. mollissima*.

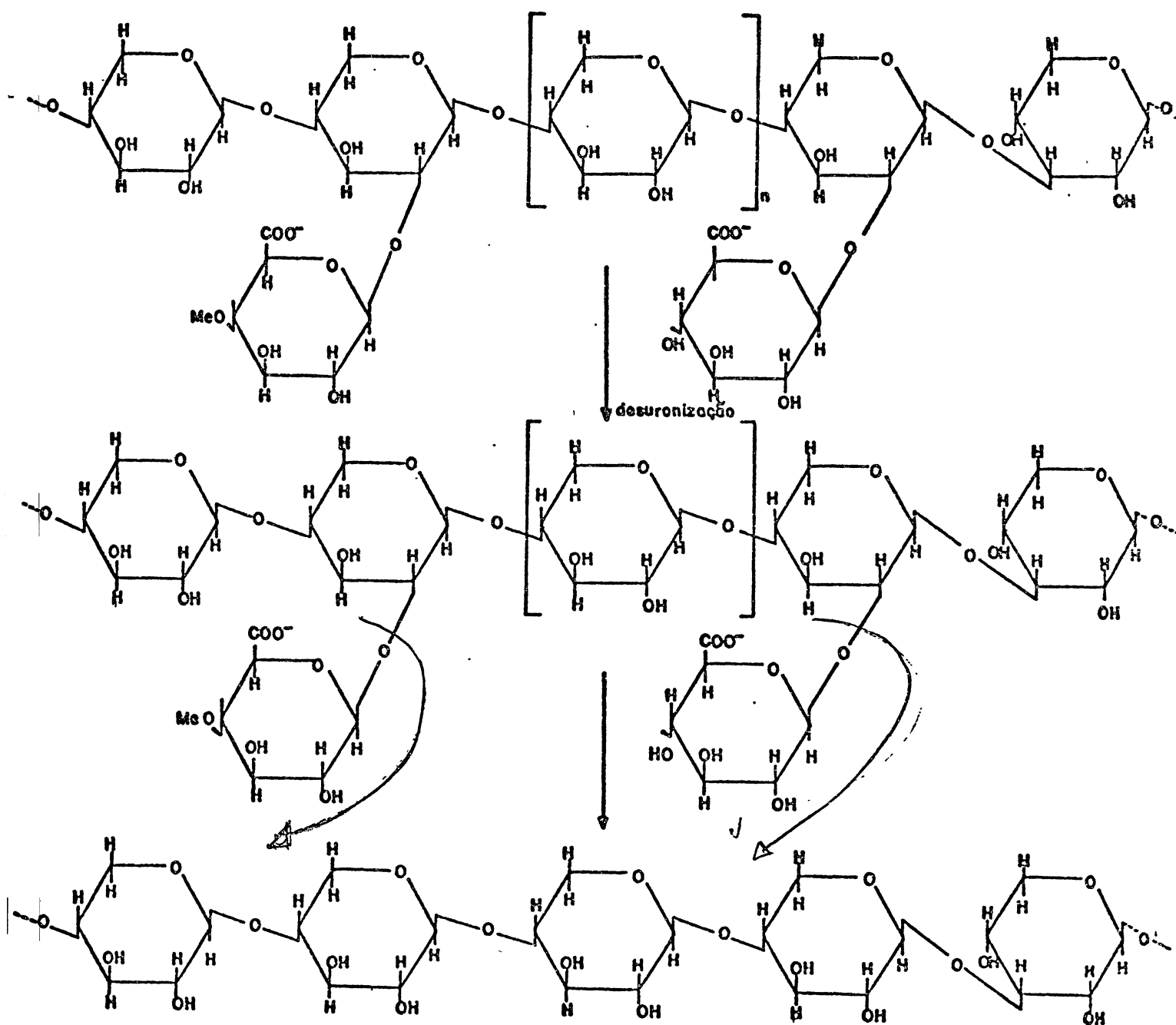


Figura 4 - Possível estrutura da Hemicelulose A da *A. mollissima* original e modificada.

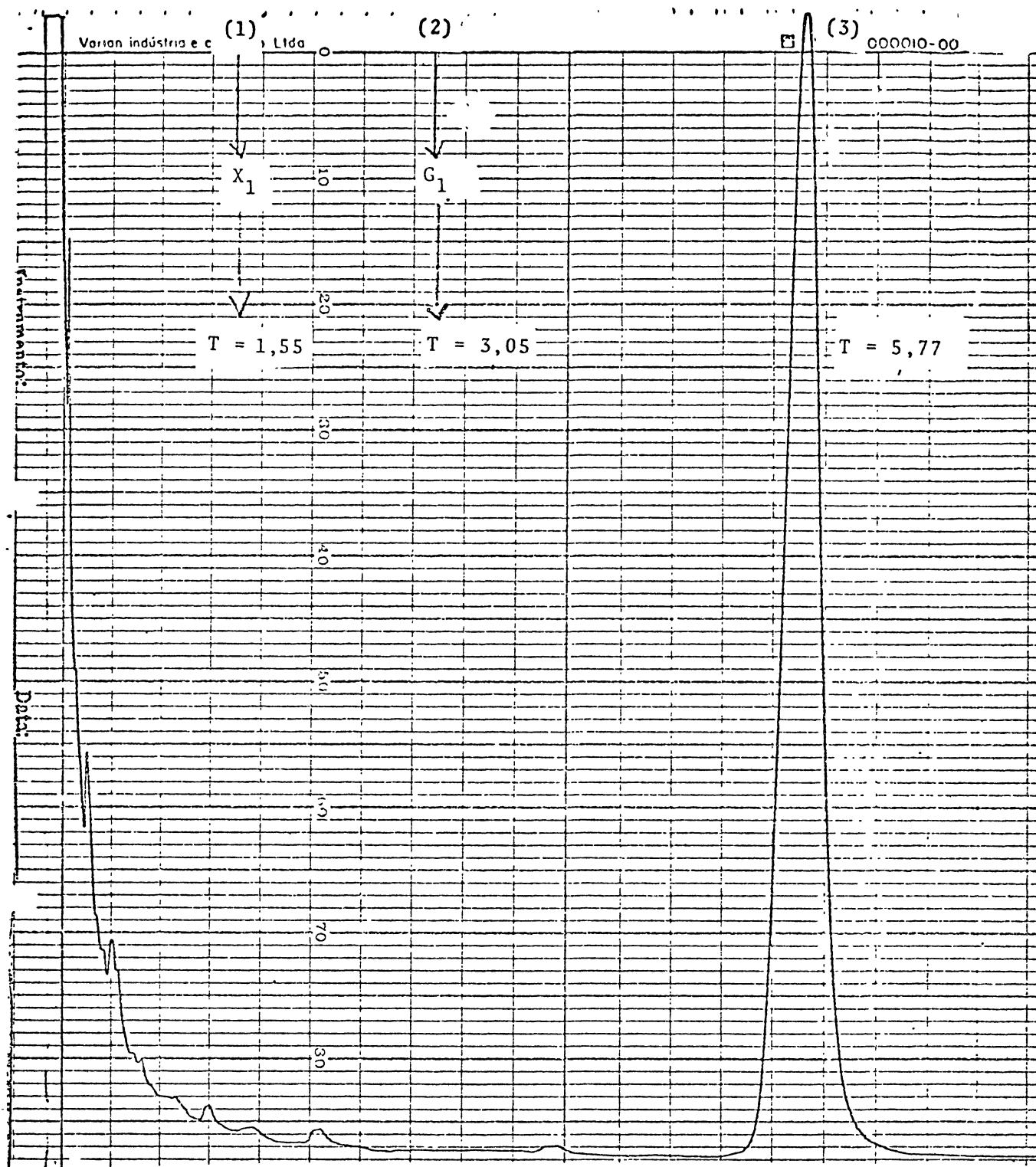


Figura 5 - Cromatografia em GLC dos produtos de hidrólise ácida parcial da fração ácida da hemicelulose DMSO.

O material foi reduzido, metilado carboxi-reduzido, acetilado e analisado em GLC na coluna B.

(1) - Posição de RT de 2,3-di-O-metil-D-xilitol.

(2) - Posição de RT de 2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol.

(3) - Posição derivado de monômero de Lignina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J.K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A New Procedure for the Determination of the Fine Structure of Polysaccharides. J. Am. Chem. Soc., 74: 4970-4971, 1952.
2. ALBERSHEIM, P. The walls of Growing Plant cells. Sci. Am. 232 (4) : 80-95, 1975.
3. ALBERSHEIM, P.; NEVINS, J.D.; ENGLISH, D.D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res., 5: 340-345, 1967.
4. ANGELY, J. Dicionário de Botânica. 2.ed. Curitiba, Instituto Paranaense de Botânica, 1959, 403 p.
5. ARTURSON, G. & GRANATH, K. Dextrans as test molecules in studies of the functional ultrastructure of Biological Membranes. Clin. Chim. Acta, 37: 309-322, 1972.
6. ASPINALL, G.O. Structural Chemistry of the Hemicelluloses. Adv. Carbohydr. Chem., 14: 429-468, 1959.
7. BAILEY, S.T. Cell walls in plants. In: MCGRAW-HILL ENCYCLOPEDIA OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2, New York, McGraw-Hill, 1960, p-615-620.
8. BAJPAI, K.S.; CHANDRASEKHARAN, V.; MUKHERJEE, S.; SRIVASTAVA, A.N. Isolation of pure aldobiuronic β Aldotriuronic from Plant Gums β Mucilages. Indian. J. Chem., 8: 45-50, 1970.
9. BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N. A critical Re-examination of Problems Inherent in Compositional Analysis of Hemicelluloses by Gas-liquid Chromatography. Carbohydr. Res., 14: 375-387, 1970..
10. BLAKE, J.D.; MURPHY, P.T.; RICHARDS, G.N. Isolation and A / B classification of hemiceluloses. Carbohydr. Res., 16: 49 - 57, 1971.
11. BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N. An examination of some methods for fractionation of plant hemicelluloses. Carbohydr. Res., 17: 253-268, 1971.

12. BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N. Evidence for molecular aggregation in hemiceluloses Carbohydr. Res., 18: 11-21, 1971.
13. BISHOP, C.T. Gas liquid Chromatography of carbihydrate derivatives. Adv. Carbohydr. Chem. 9: 95-147, 1964.
14. BITTER, T. & MUIR, H.M. A modified Uronic Acid carbazole reaction. Anal. Biochem., 4: 330-334, 1962.
15. BJORNDAL, H.; HELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B.; SVENSSON, S. Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry in Methylation Analysis of Polysaccharide. Angew. Chem. Int. Engl. Ed. 9: 610-619, 1970.
16. BOURNE, E.J. & PEAT, S. The methyl ethers of D-Glucose. Adv. Carbohydr. Chem., 5: 145-190, 1950.
17. BOUVEND, H.O. & LINDBERG, P. Native acetylated wood polysaccharide extraction with DMSO. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 147-150, 1965.
18. BUCHALA, A.J. & WILKIE, K.C.B. The ratio of β -(1-3) to β -(1-4) Glucosidic linkages in non-endospermic Hemicellulosic β -Glucans from oat plant (Avena sativa) tissues at different stages of maturity. Phytochemistry, 10: 2287 - 2291, 1971.
19. BURKART, A. Las leguminosas argentinas de la subfamilia Mimosoideas. In: _____. Las Leguminosas Argentinas. Buenos Aires, Acme Agency, 1952. p. 93-148.
20. CAMPBELL, W.G. & McDONALD, I.R.C. The Chemistry of the wood cell wall. Part I. The delignification of Beech and Spruce woods by sodium chlorite in Buffered Aqueous Solution. J. Chem. Soc.: 2644-2650, 1952.
21. CHEETHAM, N.W.H.; McILROY, R.J.; WINZOR, D.J. Polysaccharides of tropical grass species II. Electrophoretic analysis and fractionation of Sotaria sphacelata hemicellulose. Carbohydr. Res., 21: 2479-283, 1972.
22. CORRÊA, M.P. Diccionario das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1926, v. 1, 16-17.

23. CORRÊA, J.B.C. Metilação. In: _____. Métodos químicos para determinação de estrutura de polissacarídeos. Curitiba, 1971, p. 39-49. (Monografia didática).
24. CORRÊA, J.B.C.; GOMES, S.L.; GEBARA, M. Structural Features of the Hemicellulose A from the Stem of Mimosa bracaatinga. Carbohydr. Res., 60: 337-343, 1978.
25. DOWNS, F. & PIGMAN, W. Determination of O-Acetyl Groups by the Hestrin Method. Meth. Carbohydr. Chem., 7: 241-243, 1976.
26. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; ROBERTS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem., 28: 350-356, 1956.
27. DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Electrophoresis of Dyed Polysaccharides on cellulose acetate. Can. J. Chem., 46: 3079-3084, 1968.
28. DYER, J.R. Use of periodate oxidations in Biochemical Analysis. Meth. Biochem. Anal. 3: 11-147, 1956.
29. ESAU, K. O caule: estágio primário de crescimento. In: _____. Anatomia das Plantas com semente. São Paulo, E. Blücher, 1974, p. 1-183.
30. FLASCHKA, H.A. & BARNARD Jr., A. J. Chelates in Analytical Chemistry. New York, M. Dekker, 1972, v. 4, 316 p.
31. FONTANA, J.D.; GEBARA, M.; CORRÊA, J.B.C. Xilanase de Polyporus circinatus, Fr. induzida pela hemicelulase do caule de Mimosa bracaatinga, Hoehne. Cienc. Cult. (São Paulo), Suplem. 28 Reunião Anual da SBPC: 492, 1976.
32. FORD, C.W. Effect of sodium chlorite on structure of lignin-carbohydrate complexes in cellulose digest Pangola Grass. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CARBOHYDRATE CHEMISTRY, 10, 7-11. July 1980, Sydney, Australia.
33. FORBERG, L.S. & PAZUR, J.H. The characterization of hemiacetal bonds formed after periodate oxidation of heteroglycans. Carbohydr. Res., 75: 129-140, 1979.

34. FRASER, C.G. & WILKIE, K.C.B. A hemicellulosic glucan from pat leaf. Phytochemistry, 10: 199-204, 1971.
35. FRASER, C.G. & WILKIE, K.C.B. β -glucans from oat leaf tissues at different stages of maturity. Phytochemistry, 10: 1539-1542, 1971.
36. GAILLARD, B.D.E. Use of Unneutralized Hydrolysates in Paper Chromatography of Sugars. Nature, 171: 1160, 1953.
37. GAILLARD, B.D.E. Separation of linear from branched polysaccharides by precipitation as iodine complexes. Nature, 191 : 1295-1296, 1961.
38. GAILLARD, B.D.E. Separation of the hemicelluloses from plant belonging to two different plant families. Phytochemistry, 4: 631-634, 1965.
39. GAILLARD, B.D.E. & BAYLEY, R.W. Reaction with iodine of polysaccharides dissolved in strong calcium chlorite. Nature, 212: 202-203, 1966.
40. GAILLARD, B.D.E.; THOMPSON, N.S.; MORAK, A.S. The interaction of polysaccharides of the general nature of the reaction. Carbohydr. Res., 11: 509-519, 1969.
41. GAILLARD, B.D.E. & THOMPSON, N.S. Interaction of polysaccharides with iodine. Part II. The behavior of xylans in different salt solutions. Carbohydr. Res., 18: 136-146, 1971.
42. GEBARA, M. Degradação Enzimática da hemicelulose A de Mimosa bracaatinga. Curitiba, 1977, 33 p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Bioquímica.
43. GEDDES, D.S. & WILKIE, C.B. Hemicelluloses from the stem tissues of the aquatic moss. Fontanilis antipyretica. Carbohydr. Res., 18: 333-335, 1971.
44. GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 361-370, 1965.

45. GOMES, S.L. Análise Estrutural de um Metilglicuronoxilano isolado do caule da bracaatinga (Mimosa bracaatinga, Hoehne). Curitiba. 1975. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Bioquímica.
46. GUTHRIE, R.D. Periodate Oxidation. Meth. Carbohydr. Chem., 1: 432-435, 1962.
47. HAKOMORI, S. A rapid Permethylation of Glycolipid and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinil Carbanion in Dimethyl Sulfoxide. J. Biol. Chem., 55: 205-207, 1964.
48. HAY, G.W.; LEWIS, B.A., SMITH, F., UNRAU, A.M. Determination of Reducing End-Groups by Periodate Oxidation. Meth. Carbohydr. Chem., V: 251-253, 1965.
49. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate Oxidation of Polysaccharides: general procedures. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 357-361, 1965.
50. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. Quantitative Analysis of mixture of sugars by the method of partition chromatography. Part III. Determination of the sugars by oxidation with sodium periodate. J. Chem. Soc., 1659-1662, 1949.
51. HIRST, E.L. & PERCIVAL, E. Methylation of Polysaccharides and Fractionation of the Methylated Products. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 287-289, 1965.
52. JOLY, AYLTHON, B. Familia: Leguminosae. In: Botânica : Introdução à taxonomia vegetal, 2ª ed., São Paulo, Ed. Nacional, 1973. p. 371-376.
53. JONES, J.K.N. & WISE, L.E. The hemicelluloses present in Aspen wood (Populus tremuloides). Part I. J. Chem. Soc.: 2750-2756; 1952.
54. JONES, J.K.N. Hemicelluloses in hardwoods growing on southern pine sites. Wood Fiber, 9, (4), 295-307, 1978.
55. JONES, J.K.N.; PURVES, C.B.; TIMELL, T.E. Constitution of a 2-O - methylglucuronoxylan from the Wood of Trembling Aspen (Populus tremuloides Michx.). Can. J. Chem., 39: 1059-1066, 1961.

56. KATO, Y. & MATSUDA, K. Presence of a xyloglucan in the cell wall of "Phaseolus aureus" hypocotyls. Plant Cell Physiol., 17: 1185-1198, 1976.
57. KENNEDY, J.F. Determination of Formic Acid the Periodate Oxidation of Carbohydrates. Meth. Carbohydr. Chem., 6:93-100, 1972.
58. KORNFIELD, R., & KORNFIELD, S. Comparative aspects of glyco - protein structure. Ann. Rev. Biochem., 45: 217-237, 1976.
59. KOSHIJIMA, T. & AZUMA, J. Characterization of Lignin carbohydrate compound by substituted Agarose gels. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CARBOHYDRATE CHEMISTRY, 10, 7-11. July, 1980, Sydney,, Australia.
60. LABRA, G.M. A Acácia Negra. Nova fonte de riqueza para o Paraná, Curitiba, A. Boutin, s.d., 8 p.
61. LAI, Y.Z. & SARKANEN, K.V. Isolation and structural studies. In: SARKANEN, K.V. & LUDWIG, C.H. ed. Lignins; occurrence , formation, structure and reactions. New York, Wiley-Interscience, 1971. p. 165-240.
62. LARSSON, K. & SAMUEL, O. Isomerization of 4-O-M-Glucuronic acid in neutral, aqueous solution. Carbohydr. Res., 31 (1): 81-86 , 1973.
63. LINDBERG, B.; LINDH, F.; LÖNNGREN, J. Modification of Polysaccharides Containing Uronic Acid Residues. Carbohydr. Res., 61: 81-87, 1978.
64. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FAN, L.; RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin-phenol Reagents. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1961.
65. MCCREADY, R.M. Uronic Acids. α -D-Galacturonic Acid Monohydrate. Meth. Carbohydr. Chem., 2: 27-28, 1963.
66. MCILROY, R.J. The hemicellulose of Phormium tenax (N.Z.Flax). Part II. The constitution of the Aldotrionic Acid. J.Chem. Soc.: 121-124, 1949.

67. MONRO, J.A. & BAILEY, R.W. Differential alkali-extraction of hemicelulose and hydroxyproline from non-delignified cells walls of Lupin Hypocotyls. Carbohydr. Res., 41: 153-161 , 1975.
68. O'DWYER, M.H. The hemicelluloses. Part IV. The Hemicelluloses of Beech Wood. Biochem. J., 20: 656-664, 1926.
69. OLIVEIRA, M.L. Análise Estrutural e Propriedades de O-Acetil-O-Metilglucuronoxilano de Mimosa bracaatinga. Curitiba. 1977. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Bioquímica.
70. PARISH, E.J.; MCGINNIS, G.D.; BELUE, G.P.; FANG, P. Degradation of hemicellulose by piperidine. Carbohydr. Res., 39: 384-386 , 1975.
71. PEIXOTO, A.R. A Acácia Negra. Anu. Bras. Econ. Flor., 10: 175-180, 1958.
72. REICHER, F. & CORRÊA, J.B.C. Lignin carbohydrates complexes from the stem of M. bracaatinga. Arq. Biol.Tecnol., 23 (2): 158, 1980.
73. REID, J.S.G. & WILKIE, K.C.B. Total hemicelluloses from oat plants at different stages of growth. Phytochemistry, 8: 2059-2065 , 1969.
74. RUIZ-ORONÓZ, M.; NIETO ROARO, D.; LARIOS RODRIGUEZ, I. Morfologia de la celula vegetal. In: _____. Tratado elemental de botanica. 6.ed. México, Editorial Porrúa, 1960, p. 21-58.
75. SANALLA, J.L. & WHISTLER, R.L. Hemicellulose. In: MCGRAW - HILL ENCYCLOPEDIA OF SCIENCE AND TECHNOLOGY. New York, McGraw-Hill, 1960. v. 6, p. 398-399.
76. SCHUBERT, W. Lignin Biochemistry. New York, Academic, 1965 . 131 p.
77. SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 38-44, 1965.
78. SECOR, J.B.; CONN, E.E.; DUNN, J.E.; SEIGLER, D.S. Detection and identification of cyanogenic glucosides in six species of Acacia. Phytochemistry, 15: 1703-1706, 1976.

79. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S.G. Determination of Aldoses and Uronic Acid content of vegetal fiber. Anal. Biochem. 96: 282-292, 1979.
80. SHAFIZADEH, F. & MCGINNIS, D.G. Morphology and biogenesis of cellulose and plant cell-walls. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 26: 297-349, 1971.
81. SHYLUK, W.P. & TIMELL, T.E. A new method for preparing hydroxyethyl Ethers of Glucose. Can. J. Chem., 34:571-574 , 1956.
82. SRIVASTAVA, H.C. & SINGH, P.P. Structure of the polysaccharide from tamarind Kernel. Carbohydr. Res., 4:326-342, 1967.
83. STEPHEN, A.M.; KAPLAN, M., TAYLOR, G.L.; LEISENGANG, E.G. Application of Gas-Liquid Chromatography to the structural investigation of polysaccharides. Tetrahedron, 7: 233-240, 1966: Supplement.
84. STODDART, R.W.; BARRET, A.J.; NORTHCOTE, D.H. Pectic Polysaccharides of Growing Plant Tissues. Biochem. J., 102: 194-204, 1967.
85. SWARDEKER, J.S.; SLONECKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative Determination of Monosaccharides as their Alditol Acetates by Gas-Liquid Chromatography. Anal. Chem. 37: 1602-1604 , 1965.
86. SWEET, D.P.; SHAPIRO, R.H.; ALBERSHEIM, P. Quantitative analysis by various G.L.C. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. Carbohydr. Res., 40: 217-225, 1975.
87. TIMELL, T.E. Wood Hemicelluloses: Part II. Adv. Carbohydr. Chem., 20: 409-483, 1965.
88. TIMELL, T.E. Wood Hemicelluloses: Part I. Adv. Carbohydr. Chem., 19: 247-302, 1964.
89. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by use of dipping reagents. Nature, 166: 444-445, 1950.

90. TURVEY, J.R. & WILLIAMS, E.L. The structure of some xylans from red algae. Phytochemistry, 9: 2383-2388, 1970.
91. WHISTLER, R.L. Xylan. Adv. Carbohydr. Chem., 5: 269-290, 1950.
92. WHISTLER, R.L. & ROWELL, R.M. Chemistry of polysaccharides containing Glucuronic Acid. In: DUTTON, G.J. Glucuronic Acid; free and combined, New York, Academic, 1966, p. 137-182.
93. WHISTLER, R.L. & RICHARDS, E.L. Hemicelluloses. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. ed. The Carbohydrates; Chemistry and Biochemistry; New York, Academic, 1970. v. 2A, p. 447-469.
94. WILKIE, K.C.B. The hemicelluloses of grasses and cereals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 36: 215-264, 1979.
95. WISEL, W. & RATLIFF, E.K. Quantitative isolation of hemicelluloses and the summative analysis of wood. Anal. Chem., 19: 459-462, 1947.
96. WOLFROM, M.L. & FRANKS, N.E. Partial acid hydrolysis of Amylopectin. Meth. Carbohy. Chem., 4: 250-252, 1964.
97. WOLFROM, M.L. & SZAREK, W.A. Esters. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. ed. The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry, New York, Academic, 1970, v. 1A, p. 217-236.
98. ZERMIANI, A. Novos aspectos sobre a estrutura da hemicelulose A do caule de *M. bracaatinga*, Hoehne. Curitiba. 1980. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Bioquímica.